



Propriétés mécaniques locales de cellules cancéreuses de la vessie mesurées par AFM

Yara Abidine

► To cite this version:

Yara Abidine. Propriétés mécaniques locales de cellules cancéreuses de la vessie mesurées par AFM. Mécanique [physics.med-ph]. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAI046 . tel-01234563

HAL Id: tel-01234563

<https://theses.hal.science/tel-01234563>

Submitted on 27 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Matériaux, Mécanique, Génie Civil, Électrochimie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Yara ABIDINE

Thèse dirigée par **Claude VERDIER**
et coencadrée par **Valérie LAURENT**

préparée au sein du **Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, Université de Grenoble**
et de l'École Doctorale :I-MEP2

Propriétés mécaniques de cellules cancéreuses mesurées par AFM

Thèse soutenue publiquement le **8 octobre 2015**,
devant le jury composé de :

Sylvie Hénon

Professeure des Universités, Présidente

Daniel Isabey

Directeur de Recherche CNRS, Rapporteur

Karine Anselme

Directeur de Recherche CNRS, Rapporteur

Alain Duperray

Directeur de Recherche INSERM, Examineur

Claude Verdier

Directeur de Recherche CNRS, Directeur de thèse

Valérie Laurent

Maître de Conférences, Co-Encadrant de thèse



Remerciements

Un mois s'est écoulé depuis ma soutenance (et oui appelez moi Dr. Yara à présent) et je tiens à remercier par écrit toutes les personnes qui ont contribué à la sortie de ce manuscrit.

Bon commençons par le début avec mes très chers encadrants :

Je tiens à remercier Claude pour son soutien tout au long de cette thèse. J'ai apprécié toutes nos discussions scientifiques ! Je te remercie de ta confiance et de la liberté que tu m'as accordées pendant cette thèse malgré les moments difficiles (ah sacrées cellules cancéreuses). J'ai beaucoup appris et je t'en remercie du fond du cœur.

Valérie, tu as été une réelle amie pendant cette thèse et j'ai toujours eu l'impression de discuter avec une collègue. J'ai beaucoup aimé discuter de nouvelles idées à faire ou des manips que l'on pourrait réaliser. Tu es une grande source d'inspiration pour moi ! Merci pour tout !

J'ai vraiment apprécié chaque moment de la thèse en votre compagnie. Cela restera un très bon souvenir et une magnifique première expérience en recherche.

Ma thèse se situe à l'interdisciplinarité entre la physique et la biologie, je tiens donc à remercier Alain qui a toujours eu les idées biologiques intéressantes qui m'ont inspirées. Je te remercie pour toutes nos discussions !

Richard, j'ai tout particulièrement apprécié toutes nos conversations philosophiques, politiques et littéraires. J'ai appris à écouter du Monk ! Merci aussi pour tout le travail fourni sur matlab et les modèles de description. Tu as une présence importante et indispensable au labo !

Un grand merci aussi à tous les membres de l'équipe Dyfcom : Michael, pour toute la fabrication de mes fameux TPPs et pour nos discussions sur la sécurité au travail ; Salima et Thomas pour les encouragements constants et vos sourires chaleureux ; Gwennou et Philippe pour m'avoir tenu compagnie dans la salle de rhéologie pendant ma période de rédaction (qui est tombé en plein canicule, quand on pas de chance, on en a pas hein) ; Jocelyn pour toutes nos discussions ; Karin, Alexander, Sigolène, Delphine, Pierre, Philippe, Mourad, Chaouqi, Catherine, Patrice, merci à vous tous !

Je remercie aussi tous les autres membres du LIPhy et de l'IAB que j'ai côtoyé : toutes les secrétaires qui ont toujours été souriantes et chaleureuses ; Jean-Marc et Philippe ; Alexei Grichine de l'IAB qui m'a été d'une aide précieuse pour les analyses

d'images confocales ; Danièle Centanni pour la formation en salle blanche ; Lionel, Irina, tous les post-doc dont Elisabeth, Cécile, Nicolas, merci à tous ! Un grand merci aussi à Agustina Alessio de l'ED IMEP-2 et Sophie Pauc de l'INP pour tout le travail administratif et leurs sourires.

Je tiens à faire un remerciement spécial à Jessie Sitbon : ma Jessie je te remercie pour tout. Tu sais combien tu comptes pour moi et tu as toujours été à mes côtés tout au long de cette thèse. Merci pour nos sorties et nos discussions philosophiques, artistiques, religieuses et politiques. C'est un honneur pour moi de t'avoir rencontré.

Cette thèse a aussi été l'occasion de rencontrer plein d'autres doctorants et je tiens à les remercier pour leur bonne humeur, leur ragots et les jeux de société en cachette après le déjeuner (décidément je n'aurais gagné qu'une seule fois). Il y a trois ans, j'étais toute nouvelle au labo et à l'époque il n'y avait pas beaucoup de doctorants, et c'est tout naturellement que je me suis rapprochée de Flore. Bien que je l'ai traumatisée dès le premier jour en lui racontant toute ma vie (mais apparemment les gens s'habituent vite au fait que je parle vite et beaucoup), nous avons passé les 6 premiers mois de thèse collées l'une à l'autre¹. Puis est venu le PhD week-end qui nous a permis de rencontrer les autres doctorants du LIPhy. Et avec Richard nous avons amorcé le contact entre 1er et 3ème étage, et c'est ainsi que s'est formé le trio YFR². Flore et Richard, merci pour tout, les week end et soirées auraient été bien longs et solitaires au labo sans vous deux ! Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de succès à Singapour ou ailleurs !

Merci aux autres membres du Cercle des Docteurs Inconnus : Marie-C, qui a toujours la pêche et sait mettre tout le monde de bonne humeur, Seb, Mathieu, Johannes, Zaiyi, Othmane, Alex, Pierre-Yves, Daria, Sophia (bientôt docteur)... merci !

Je remercie aussi Vinoth : thank you a lot Vinoth for these past years. We had so many difficulties for some protocols and I am happy we worked together and solved them all. It was a pleasure working with you.

Bon, ensuite il y a eu l'arrivée des stagiaires dont Diane, Vassanti, Matthieu, Rachel, Sid, Pretti, Mariana, Laure : Merci à vous pour les bons moments ! Vassanti merci beaucoup pour nos moments de rigolade et merci pour l'organisation du cadeau avec Laure ! Diane pour toutes les discussions sur la vie ; Matthieu merci pour ton rôle en tant que responsable des doctorants (et d'ailleurs merci à Richard et Rachel d'avoir pris ce rôle aussi) ; Mariana, Sid and Pretti, thank you for everything !

Laure (siamoise !), je veux te remercier pour ton amitié, ta bonne humeur et ta gentillesse. Ces deux dernières années je me suis sentie moins seule quand on était deux à courir et hurler à la vue d'une abeille sans défense. Je te souhaite une bonne fin de thèse et beaucoup de bonheur dans ta vie !

Ensuite il y a eu tous les nouveaux thésards : Ianis, j'ai adoré discuter avec toi sur le monde, tu m'as toujours impressionnée avec ta créativité, ne changes surtout

1. Pas littéralement hein

2. Je viens d'inventer cet acronyme (spécialité française)

pas ; Léo, merci pour ta bonne humeur et nos discussions sur les cheveux (Parce que je le vau**x** bien) ; Loic pour toutes nos conversations super intéressantes ; Thomas, IPBééééé ; Adel, Mehdi, Joe.. Bon courage à vous tous pour la fin de votre thèse !

Je veux aussi remercier tous les occupants à mi-temps de la salle 316 (en fait pendant trois ans, j'ai été la seule occupante fixe du bureau) : Mohammar, Manu, Weifan³, Laure, le monsieur russe dont j'ai oublié le nom, Brenna, Thevy, Daria, Nawal. Mon bureau va me manquer. En fait, le LIPhy va me manquer. J'ai vraiment passé de très bon moments dans ce laboratoire et je remercie TOUT LE MONDE !

Je remercie aussi Taghrid pour sa bonne humeur constante. Tu as été comme une grande sœur pour moi pendant ces trois ans, et malgré tous tes problèmes tu as toujours été présente pour moi. Tu vas beaucoup me manquer et je te dis à bientôt dans l'espoir de se revoir un jour en Syrie, ce magnifique pays qui me manque tant.

Je remercie aussi Tante Samar, Fauve, Sonia, Emira pour tout votre soutien ! Vous êtes toutes très importantes pour moi et je ne vous remercierais jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi. Je remercie aussi les anciens IPB/MEB (Merci Joseph d'avoir fait le déplacement pour voir ma soutenance).

Et enfin, last but not least, je veux remercier ma famille. J'ai la chance incommensurable d'avoir les meilleurs parents au monde (non non je n'exagère pas). Depuis toute petite, j'ai toujours eu leur soutien illimité (émotionnel et financier⁴) dans les moments durs et cela m'a donné le courage d'entreprendre des projets difficiles et longs. Je savais que même si je tombais en route, vous seriez présents pour me relever et me pousser par derrière. Je réalise que c'est une chance d'avoir des parents si aimants, si généreux, si présents. Si je suis là où je suis, c'est complètement grâce à vous⁵. Je vous dois absolument tout et j'espère que vous êtes fiers de moi. Je vous aime.

Racan et Lino, je vous souhaite tout le succès et le bonheur du monde. Merci d'être venu assister à ma soutenance, je suis très fière de vous et je vous aime très fort. Je remercie aussi tout le reste de ma famille et amis pour le soutien constant.

Voilà, les amis, je conclue ce chapitre de ma vie en vous remerciant tous (encore) !
Le chapitre est fini mais l'histoire ne fait que commencer. A bientôt !

3. L'auteur s'excuse pour tout fau**x**te dans les prénoms

4. J'essaierais de vous rembourser un jour. Inchallah. Mais bon faudra être très patients.

5. C'est ma mère qui m'a conseillé d'appeler Claude et Valérie quand j'étais réticente à l'idée de venir à Grenoble (les vaches et tout ça). Elle a de bons conseils ma maman quand même.

Résumés

La formation des métastases à partir des cellules cancéreuses est un processus caractérisé par un comportement anormal de la cellule. Les propriétés mécaniques particulières des cellules cancéreuses est l'une des caractéristiques pathologiques principale. Ces propriétés sont liées à leurs capacités à envahir les tissus avoisinants, à migrer vers de nouveaux sites et à proliférer. La progression du cancer est caractérisée par la perturbation et la réorganisation du cytosquelette d'actine ainsi que par les changements des propriétés mécaniques des cellules, probablement liés à la capacité dupliquée des cellules cancéreuses à migrer et à s'adapter à l'environnement. Les propriétés mécaniques sont essentielles pour la régulation des fonctions cellulaires comme la migration, l'adhésion, la prolifération, et la différenciation, et les anomalies sont associées aux pathologies, en particulier le cancer. Les propriétés mécaniques sont aussi dépendantes du micro-environnement de la cellule : la rigidité des substrats modifie les propriétés mécaniques internes des cellules, ainsi que la structure du cytosquelette. Comprendre les processus impliqués dans les variations des propriétés viscoélastiques est donc essentiel pour l'étude de la progression des tumeurs. La microscopie à force atomique (AFM) a prouvé être un outil fiable pour sonder les propriétés mécaniques statiques et dynamiques (sur une grande gamme de fréquence)s de matériaux mous, comme les échantillons biologiques, à de petites échelles et grande résolution. Dans cette étude, nous proposons de nouveaux marqueurs du cancer basé sur une approche mécanobiologique. Les propriétés viscoélastiques de cellules cancéreuses de la vessie sont mesurées par des expériences d'indentation dynamiques par AFM. Cette méthode est validée en utilisant des gels de polyacrylamide et un modèle à fractions dérivées est proposé pour décrire le comportement mécanique de ces gels. Ensuite, le module de cisaillement complexe de trois lignées cellulaires à potentiel métastatique différent est mesuré à trois positions différentes de la cellule : le noyau, le périnoyau et la périphérie de la cellule. En utilisant des drogues d'inhibition de l'actine, les propriétés mécaniques sont corrélées à la microstructure de l'actine obtenue par microscopie confocale. Nous proposons un modèle en loi de puissance simplifié pour décrire le comportement des modules élastiques G' et visqueux G'' . Une relation entre l'invasivité des cellules cancéreuses et leur propriétés mécaniques est aussi mis en avant. En particulier, nous trouvons que le plateau élastique et la fréquence de transition (quand $G'=G''$) peuvent être utilisés comme marqueurs d'invasivité. Enfin, nous mesurons le module de cisaillement

complexe de cellules cancéreuses adhérentes sur des environnements mécaniques et biologiques différents, et des propriétés intrigantes de la périphérie des cellules cancéreuses sont reportées.

Cancer cell metastasis is a multi-stage process characterized by cell malfunctional behavior. Some of the major pathological characteristics of cancer cells are their particular mechanical properties which are linked to their ability to invade surrounding tissues, transmigrate and proliferate at new sites. There are evidences that cancer progression is characterized by disruption and reorganization of the actin cytoskeleton as well as changes in the mechanical properties. This change is probably associated with the enhanced capability of cancer cells to migrate and adapt to changing environments. The mechanical properties are essential for the regulation of cell functions like migration, adhesion, proliferation and differentiation, and abnormalities are connected with pathologies, in particular cancer metastasis. The mechanical properties are also dependent on the micro-environment of the cell, as substrate stiffness changes cell internal mechanical properties, as well as the cytoskeleton structure. Thus, the understanding of the mechanics involved in the variation of the viscoelastic properties is crucial for the study of tumor progression. Atomic force microscopy (AFM) has proved to be a reliable tool to probe static and frequency-dependent mechanical properties of soft materials, like biological specimens, at small scale with high resolution. In this study, we propose new markers of cancer metastasis based on a cell mechanics approach. We report on the viscoelastic properties of human bladder cancer cells measured by dynamic indentation experiments using AFM. This method is first calibrated using polyacrylamide gels and a fractional model is proposed to describe the behavior of such gels. We then investigate the complex shear modulus of three different cell lines with different metastatic potential. We probe the elastic G' and viscous G'' modulus at three different locations across the cell : nucleus, perinucleus and the cell periphery. With the use of actin inhibitory drugs, we correlate mechanical properties and the actin microstructure obtained by confocal microscopy imaging. We propose a simplified power-law model to describe the behavior of the elastic and viscous moduli. We also report a relationship between the malignancy of cancer cells and their viscoelastic properties. In particular, we find that the elastic plateau modulus and the transition frequency (frequency at which $G' = G''$) can be used as markers of invasiveness. Then, we probe the complex shear modulus of cancer cells on different mechanical and biological environments and we report intriguing properties of the periphery of cancer cells.

Table des matières

Table des figures	xv
Liste des tableaux	xvii
Préambule	1
1 Contexte biomécanique	5
1.1 La mécanique de la cellule	6
1.1.1 Les propriétés mécaniques des cellules vivantes	6
1.1.2 L'influence de l'environnement	9
1.1.3 La viscoélasticité de la cellule	11
1.1.3.1 Notions de viscoélasticité	11
1.1.3.2 Application à la cellule vivante	15
1.2 Les composants cellulaires et leur rôle mécanique	17
1.2.1 La cellule	17
1.2.2 La membrane plasmique	18
1.2.3 Le cytosquelette	20
1.2.3.1 Les microtubules	22
1.2.3.2 Les filaments d'actine	23
1.2.3.3 Les filaments intermédiaires	26
1.2.3.4 Les moteurs moléculaires et la contractilité	28
1.2.4 La mécanique du cytosquelette	30
1.2.5 L'adhésion et les intégrines	35
1.3 La mécanique du cancer	35
1.4 Sonder la mécanique cellulaire : mesure et théorie	39
1.4.1 Techniques de mesure	40
1.4.1.1 Les pinces optiques et magnétiques	40
1.4.1.2 La microscopie à force atomique	42
1.4.1.3 Méthodes passives	42
1.4.2 Autres méthodes	43
1.4.3 Modèles théoriques	43
1.4.3.1 Modèles viscoélastiques	44
1.4.3.2 Modèle SGR (Soft Glassy Rheology)	45

1.4.3.3	Modèle de tenségrité	46
1.4.3.4	Les gels actifs	46
1.5	Les objectifs de cette thèse	47
2	La microscopie à force atomique	49
2.1	Introduction à la microscopie à force atomique	49
2.1.1	Principe de l'AFM	49
2.1.2	Modes d'opération de l'AFM	50
2.1.2.1	Mode statique de contact	51
2.1.2.2	Mode dynamique	51
2.2	Mesurer les propriétés mécaniques de cellules vivantes avec un AFM	52
2.2.1	Les leviers	54
2.2.2	Calibration de la constante de raideur	56
2.2.3	Modèles de contact (Hertz)	58
2.2.4	Mesure de la viscoélasticité en mode "modulation de force"	59
2.2.4.1	Mesure du module de cisaillement	59
2.2.4.2	Correction de la traînée hydrodynamique	61
2.2.4.3	Correction de l'effet du substrat	64
2.3	Validation du protocole en utilisant des gels de polyacrylamide	66
2.3.1	Matériels et méthodes	67
2.3.1.1	Méthodes de mesure : AFM et rhéomètre classique	67
2.3.1.2	Gels de polyacrylamide	67
2.3.2	Comparaison entre les pointes pyramidales et sphériques	68
2.3.3	Comparaison du module d'Young et du module de cisaillement	69
2.3.4	Résultats	70
2.3.4.1	Microrhéologie de gel de polyacrylamide	70
2.3.4.2	Modèle rhéologique aux dérivées fractionnaires	71
2.3.5	Discussion	72
3	L'influence du cytosquelette et de l'invasivité sur les propriétés viscoélastiques. Application aux cellules cancéreuses de la vessie.	77
3.1	Le cancer de la vessie	77
3.2	Matériels et méthodes	79
3.2.1	Culture des cellules cancéreuses	79
3.2.2	Perturbation du réseau d'actine	79
3.2.3	Microscopie confocale	80
3.2.4	AFM en mode dynamique	80
3.2.5	Modèle rhéologique simplifié	81
3.3	Influence du cytosquelette sur les propriétés viscoélastiques	82
3.3.1	Hétérogénéité des propriétés viscoélastiques de cellules cancéreuses T24	82
3.3.2	Influence de l'actine sur les propriétés mécaniques	85
3.3.2.1	Variation de l'intensité de fluorescence	85

3.3.2.2	Inhibition de la polymérisation de l'actine (LatrunculinA)	87
3.3.2.3	Inhibition de la contractilité acto-myosine (Y27632)	89
3.3.2.4	Stabilisation du réseau d'actine (Jasplakinolide)	91
3.4	Influence de l'invasivité sur les propriétés viscoélastiques	93
3.4.1	Le rôle de l'actine sur l'invasivité	93
3.4.2	Les propriétés mécaniques et l'invasivité	95
3.5	Conclusions	99
4	Environnement et propriétés viscoélastiques	101
4.1	Environnement mécanique : gels de polyacrylamide	102
4.1.1	Préparation et rigidité des gels de polyacrylamide	102
4.1.2	L'influence des gels sur les propriétés de la cellule	102
4.2	Environnement biologique : monocouches endothéliales HUVECs	104
4.2.1	Propriétés mécaniques des HUVECs	104
4.2.2	L'influence de la monocouche sur les propriétés de la cellule	106
4.3	Correction de l'effet de substrats mous	108
4.3.1	Expression du module de cisaillement corrigé	108
4.3.2	Application au gel et monocouche d'HUVEC	111
4.4	Discussion et comparaison entre différents environnements	112
5	Conclusions et perspectives	119
A	Microrhéologie par AFM	125
B	Microscopie confocale : expérience et analyse	133
C	Fabrication des gels de polyacrylamide	137
D	Publications et communications en congrès	141

Table des figures

1.1	Grandeurs fondamentales pour la caractérisation mécanique d'un matériau	12
1.2	Représentation d'un solide élastique et d'un fluide visqueux	13
1.3	Modèle de Maxwell	13
1.4	Modules de conservation et de perte	16
1.5	Schéma de cellule animale	18
1.6	Schéma simplifié de cellule animale	19
1.7	Schéma de la membrane plasmique	20
1.8	Filaments du cytosquelette	21
1.9	Illustration des trois filaments constituant le cytosquelette	21
1.10	Structure d'un microtubule et de ses sous-unités	24
1.11	Structure d'un filament d'actine	25
1.12	Modèle théorique de réseau d'actine	26
1.13	Structure d'un filament intermédiaire	27
1.14	Structure de l'actine en fonction des forces	29
1.15	Courbes contrainte-déformation de biopolymères	32
1.16	Module G' de biopolymères en fonction de la concentration	33
1.17	Processus cancéreux	36
1.18	Modèle de l'homéostasie de tension	38
1.19	Techniques utilisées pour sonder la microrhéologie des cellules	41
2.1	Principe de la microscopie à force atomique	50
2.2	Modes de l'AFM	51
2.3	Courbe de force par AFM	52
2.4	Image d'une cellule T24 et de la pointe AFM	53
2.5	AFM (JPK Nanowizard 2)	54
2.6	Tête AFM	54
2.7	Levier avec une pointe pyramidale MLCT	55
2.8	Les leviers en tant que ressort	55
2.9	La pointe pyramidale	56
2.10	Schéma de la courbe de résonance du levier	57
2.11	Schéma de modulation de force	60
2.12	Schéma de l'approche de la pointe	60
2.13	Courbes de déflexion et hauteurs obtenues par AFM	62

2.14	Fonction de transfert de la traînée hydrodynamique	63
2.15	Facteur de correction $b(h)$ en fonction de la hauteur	64
2.16	Comparaison entre pointes pyramidale et sphérique	68
2.17	Comparaison entre E et G'	70
2.18	Superposition des mesures rhéométriques et AFM	70
2.19	Modèle rhéologique	72
2.20	Rhéologie des gels de polyacrylamide	73
2.21	Paramètre G_N^0 en fonction de la concentration en acrylamide	73
2.22	Paramètre f_T en fonction de la concentration en acrylamide	74
3.1	Schéma des couches cellulaires de la vessie	78
3.2	Modèle rhéologique simplifié appliqué au gel de polyacrylamide	81
3.3	G' et G'' au dessus du noyau	83
3.4	G' et G'' à différentes positions de la cellule	84
3.5	Paramètres G_N^0 , a et b , et la fluorescence	84
3.6	Images confocales de T24 en présence de drogues (LatrunculinA, Y27632 et Jasplakinolide)	86
3.7	Intensité de fluorescence normalisée en présence de drogues (LatrunculinA, Y27632 et Jasplakinolide)	87
3.8	Cellule T24 : G' et G'' avant et après rajout de LatrunculinA	88
3.9	Cellule T24 : paramètre G_N^0 et l'intensité de fluorescence en fonction du temps	89
3.10	Cellule T24 : G' et G'' avant et après rajout de Y27632	90
3.11	Cellule T24 : G' et G'' avant et après rajout de Jasplakinolide	92
3.12	Images confocales de trois lignées cellulaires : RT112, T24 et J82	94
3.13	Intensité de fluorescence en fonction de l'invasivité	95
3.14	Modules G' et G'' des lignées RT112, T24 et J82	96
3.15	Paramètres G_N^0 , f_T , a , b et fluorescence des lignées RT112, T24 et J82	97
3.16	Paramètres G_N^0 et f_T en fonction de la fluorescence des lignées RT112, T24 et J82	98
4.1	Schéma du lien entre cellules et ECM	101
4.2	Module d'Young des gels de polyacrylamide en fonction de la concentration en réticulant	103
4.3	Images en fluorescence de cellules T24 sur verre et sur gel de rigidité différente	104
4.4	Modules G' et G'' de trois lignées cellulaires sur un gel de 8kPa	105
4.5	Modules G' et G'' de cellules HUVECs	105
4.6	Image d'une cellule T24 sur une monocouche HUVEC	106
4.7	Image d'une cellule J82 sur une monocouche HUVEC en fonction du temps	107
4.8	Modules G' et G'' de trois lignées cellulaires sur une monocouche de Huvec	107

4.9	Schéma du système d'indentation avec deux couches de rigidité différente	108
4.10	Module de contact apparent en fonction de l'indentation relative	109
4.11	Correction de l'effet du substrat (gel 8 kPa)	113
4.12	Correction de l'effet du substrat (monocouche HUVEC 9 kPa)	114
4.13	G_N^0 et f_T en fonction de la rigidité du substrat	114
4.14	G_N^0 et f_T pour un gel de $E=8\text{kPa}$ et des Huvecs ($E=9\text{kPa}$)	115
4.15	G_N^0 et f_T en fonction de la rigidité (HUVEC inclus)	116
A.1	Puce Bruker avec différentes pointes MLCT et tête AFM	125
A.2	Calibration du levier	126
A.3	Courbe de force en mode contact	127
A.4	Courbe d'approche pour calcul de δ_0	128
A.5	Indentation initiale en fonction du setpoint	129
A.6	Script de microrhéologie	130
A.7	Courbes de Z et d pour une fréquence de 10 Hz	130
A.8	Détermination de la hauteur de la cellule	131
B.1	Microscope confocal Leica	133
B.2	Analyse des images confocales avec ImageJ : projection en Z	134
B.3	Analyse des images confocales avec ImageJ : binarisation des images .	135
B.4	Analyse des images confocales avec ImageJ : contours de chaque région	135
C.1	Boite TPP	138
C.2	Images du protocole de préparation	139

Liste des tableaux

1.1	Propriétés des trois composantes du cytosquelette	22
1.2	Techniques de mesure de la microrhéologie des cellules	44
2.1	Correction de l'effet du substrat	67
2.2	Paramètres issus de l'ajustement du modèle rhéologique	72
3.1	Stades et grades des lignées cancéreuses du cancer de la vessie	79
3.2	Gel de polyacrylamide : Paramètres issus du modèle simplifié	82
3.3	Cellule T24 : paramètres issus de l'ajustement de G' et G'' en présence de LatrunculinA	89
3.4	Cellule T24 : paramètres issus de l'ajustement de G' et G'' en présence de Y27632	91
3.5	Paramètres issus de l'ajustement de G' et G'' des lignées RT112, T24 et J82	98
C.1	Préparation des gels de polyacrylamide	139

Préambule

Pendant la cancérogenèse, des modifications liées au cancer changent les structures internes des cellules mais aussi leur environnement comme la matrice extracellulaire. Le domaine de la biologie cellulaire, au centre des études sur les pathologies humaines, cherche à élucider les fonctions cellulaires grâce à une meilleure compréhension des processus physiologiques, des structures cellulaires et l'interaction des cellules avec l'environnement extracellulaire. Jusqu'à récemment, l'étude des problèmes élémentaires de la biologie cellulaire se faisait exclusivement dans le contexte de la biochimie et grâce à des approches moléculaires et génétiques. Les processus pathologiques peuvent être considérés comme une perturbation des signaux biochimiques normaux. Cependant, récemment, les liens entre les propriétés mécaniques et les processus cellulaires sont au centre des études sur la biologie cellulaire. Les phénomènes mécaniques sont critiques pour la régulation et le fonctionnement des processus cellulaires élémentaires et les charges mécaniques peuvent réguler les fonctions de la cellule, dont la division, la migration, la différenciation, etc. Des perturbations dans la perception mécanique sont impliquées dans une variété de pathologies dont le cancer. Ceci a conduit à l'émergence d'une nouvelle discipline qui associe la mécanique et la biologie cellulaire : la mécano-biologie cellulaire. Ce terme décrit tout aspect de la biologie cellulaire dans lequel une force mécanique est générée, perçue ou qui conduit à des changements de la fonction cellulaire. L'étude de la mécano-biologie fait le pont entre la biologie cellulaire et la biochimie et une variété de disciplines de la mécanique dont la mécanique des solides et fluides.

Le comportement rhéologique des cellules est très complexe : elles ne peuvent être décrites ni comme des solides élastiques ni comme des liquides visqueux. De tels matériaux sont dits viscoélastiques et se déforment en réponse à une contrainte qui dépend du temps ou de la fréquence. Les avancées techniques ont permis l'étude des propriétés mécaniques de cellules ou tissus, notamment la microscopie à force atomique (AFM), qui a montré sa capacité à sonder des cellules uniques et mettre en relation la mécanique de la cellule et des pathologies comme le cancer. Les premières mesures sur cellules du carcinome de la vessie par AFM ont montré que les cellules cancéreuses sont moins rigides que les cellules non-cancéreuses. Des études plus poussées ont confirmé qu'une baisse du module d'Young est une caractéristique du potentiel métastatique. Cette variation est associée à la capacité décuplée de migrer et de s'adapter aux environnements qui est observée pendant le

processus de formation de métastases. Ces mesures sont valables pour d'autres types de cancer mais aussi pour des cellules normales et des tissus. Il est maintenant bien établi que le cytosquelette d'actine est en grande partie responsable des propriétés mécaniques de la cellule. C'est pourquoi il y a eu de nombreux efforts pour relier la microstructure aux propriétés mécaniques.

Dans cette étude, nous utilisons l'AFM en mode dynamique pour étudier l'influence du potentiel métastatique, de la structure du cytosquelette d'actine et de l'environnement de cellules cancéreuses de la vessie sur les propriétés mécaniques. La force est alors appliquée via une pointe pyramidale indentée dans la cellule et on peut mesurer le module de cisaillement complexe G^* . L'objectif de ce travail est aussi de relier les propriétés mécaniques à la microstructure du cytosquelette d'actine visualisée en microscopie confocale .

Ce manuscrit se décompose en quatre chapitres.

Le premier présente le contexte biologique et biomécanique dans lequel s'inscrit notre étude. Le domaine mécano-biologique est passé en revue suivi, d'une description des constituants du cytosquelette et ses propriétés mécaniques. Enfin, les techniques de mesures des propriétés mécaniques de la cellule ainsi que des modèles de description existants sont présentés.

Dans le deuxième chapitre, le dispositif expérimental est présenté ainsi que les principes sous-jacents. Les détails de la mise au point du protocole, dont les corrections effectuées, le choix de la pointe et le modèle pour décrire le comportement viscoélastique sont présentés. Enfin la validation du protocole est montré en utilisant des gels de polyacrylamide.

Dans le troisième chapitre, l'influence de la microstructure du cytosquelette est présentée. Trois drogues qui perturbent le réseau d'actine et sa dynamique ont été utilisées : LatrunculinA, Y27632 et Jasplakinolide. Les mesures sont locales et sont effectuées à trois positions différentes de la cellule (le noyau, le périnoyau et la périphérie). Nous montrons que les propriétés mécaniques sont locales et que la contribution de l'actine est essentielle. Nous mettons en évidence le comportement mécanique particulier de la périphérie de la cellule. Nous nous focalisons sur le lien entre l'invasivité des cellules cancéreuses, la microstructure de l'actine et les propriétés mécaniques. Deux paramètres, le plateau élastique et surtout la fréquence de transition, se révèlent être une signature du potentiel métastatique. Le caractère particulier de la périphérie est encore observé.

Enfin, dans le quatrième chapitre, l'influence de l'environnement sur les propriétés mécaniques est étudié. Différents substrats mécaniques ou biologiques sont utilisés : des gels de polyacrylamide de rigidité différente et une monocouche de cellules endothéliales HUVEC. Le défi dans cette partie est de pouvoir corriger les mesures effectuées sur gel mou. Ces expériences montrent la périphérie des cellules cancéreuses est plus sensible à l'environnement que le centre de la cellule.

Des annexes viennent compléter ce manuscrit.

Chapitre 1

Contexte biomécanique

Tous les organismes vivants sont constitués de cellules. Pour effectuer leur fonctions spécifiques, les cellules doivent utiliser l'information génétique, synthétiser, trier, stocker et transporter des biomolécules, convertir différentes formes d'énergies, transformer des signaux chimiques en signaux biologiques, maintenir les structures internes et répondre aux environnements externes. Beaucoup de ces processus impliquent des aspects biomécaniques. Les forces mécaniques, qui sont exercées par pratiquement toutes les cellules eucaryotes, sont à la base de la plupart des processus cellulaires, dont la migration, la différenciation, la reproduction et maintiennent les propriétés mécaniques internes des cellules (Engler et al., 2006; Discher et al., 2005; Gardel et al., 2010; Eyckmans et al., 2011). Ces mêmes forces sont soumises à un rétro contrôle par des signaux biochimiques pour réguler les fonctions cellulaires (mitose, différenciation etc). De plus, il a été montré que les forces mécaniques jouent un rôle dans le développement de certaines pathologies ainsi que leur progression comme le cancer (Koch et al., 2012; Kumar and Weaver, 2009; Suresh, 2007). Le but actuel du domaine de la recherche en biomécanique cellulaire est de combiner des approches théoriques et expérimentales en biologie, biophysique et biochimie pour construire une description du comportement mécanique des cellules. Pour ce faire, les méthodes expérimentales biotechnologiques deviennent de plus en plus diverses et l'interprétation des résultats de plus en plus complexe.

Ce chapitre résume le contexte dans lequel s'inscrit cette étude : caractériser les propriétés mécaniques de cellules cancéreuses en fonction de l'organisation intracellulaire du cytosquelette d'actine, le potentiel métastatique et l'environnement. En effet, un grand nombre de processus nécessaires à la vie des cellules et au développement des tissus dépend de leur capacité à se déformer, à transmettre des forces, ou à effectuer des mouvements coordonnés ou dirigés. Cela est rendu possible grâce au réseau dynamique de protéines en constante réorganisation qui constitue l'architecture des cellules eucaryotes, le cytosquelette, ainsi que l'environnement avoisinant les cellules. Comprendre et caractériser le lien entre ces fonctions et les propriétés mécaniques permettra de définir un marqueur du potentiel métastatique de cellules cancéreuses de la vessie.

Une introduction au domaine de la biomécanique de la cellule est tout d’abord donnée, suivie d’une présentation des caractéristiques biologiques des composants de la cellule, dont le cytosquelette d’actine. La mécanique du cancer est introduite et enfin, je résume les techniques utilisées pour sonder la mécanique cellulaire comme la microscopie à force atomique (AFM), ainsi que les modèles théoriques.

1.1 La mécanique de la cellule

Le domaine de la mécanobiologie cellulaire essaie de comprendre comment les cellules migrent, se déforment, interagissent, comment elles ressentent, génèrent et répondent aux forces mécaniques. Des modifications de la fonction cellulaire dues à des processus biochimiques ou des pathologies peuvent significativement modifier les propriétés mécaniques de la cellule. En conséquence, les propriétés mécaniques des cellules peuvent être utilisées comme indicateur de leurs état biologiques et peuvent fournir des connaissances approfondies sur la pathologie ([Bao and Suresh, 2003](#); [Zhu et al., 2000](#); [Suresh, 2007](#); [Ingber et al., 1995](#)).

1.1.1 Les propriétés mécaniques des cellules vivantes

Dans les années 1990, le domaine de la mécanique de la cellule connaît une expansion importante ; le centre d’intérêt des chercheurs étant de définir comment la cellule effectue du travail mécanique lorsqu’elle se déplace sur un substrat. Dès le début du 20ème siècle, il est admis que les cellules doivent exercer ou subir une force pour migrer sur un environnement extracellulaire. Pendant leur développement, les forces collectives exercées par un groupe de cellules entraînent des événements de réorganisation qui génèrent des tissus et organes distincts ([Thompson, 1917](#); [Belousov et al., 1975](#)). Cependant, même s’il est connu que des forces physiques sont à l’origine de ces événements, la mesure quantitative des forces générées par des cellules isolées, ou tissus est difficile à l’époque. Déjà au 18ème siècle, des transitions sol-gel sont reconnues dans le cytoplasme de cellules amiboïdes par [Rosenhof \(1744\)](#) et un écoulement dans les cellules des plantes apporte les premières données quantitatives d’une viscosité non-newtonienne. Dans les années 1920, des particules magnétiques microscopiques sont manipulées dans les cellules pour obtenir des mesures quantitatives de paramètres élastiques et visqueux par microrhéologie ([Freundlich and Seifriz, 1922](#); [Seifriz, 1923](#)). Dans les années 1980, [Harris et al. \(1980\)](#) montrent que les cellules adhérentes exercent des forces significatives sur leurs environnements. Il remarque que les fibroblastes créent des rides sur une membrane de silicone qui apparaissent et disparaissent alors que la cellule migre sur la membrane. En étudiant l’amplitude et la direction de ces forces et en corrélant avec des images de la dynamique des points focaux d’adhésion, il en conclut que l’adhésion de la cellule à son environnement est essentielle pour la migration. Fin des années 1990, un lien est effectué entre la motilité des cellules et les forces. Des chercheurs remarquent que

les fibroblastes 'rampent' comme des chenilles en tirant le corps cellulaire en avant et en utilisant des forces contractiles (Stossel, 1993).

Récemment, les chercheurs se concentrent sur l'étude de la dynamique du cytosquelette et l'interaction entre la cellule et la matrice extra-cellulaire (ECM) en fonction de la forme, la fonction, la déformabilité et les propriétés mécaniques des cellules. Ces études s'intéressent également à la viscoélasticité et à la connection entre les structures sub-cellulaires comme les microtubules, les filaments d'actine et les filaments intermédiaires ainsi que l'effet des perturbations mécaniques sur les processus cellulaires (Vogel and Sheetz, 2006; Bershadsky et al., 2006).

Les propriétés biomécaniques des cellules sont essentiellement déterminées par le cytosquelette (Bao and Suresh, 2003; Zhu et al., 2000; Laurent et al., 2003), qui est remodelé pendant la migration cellulaire, l'adhésion, la prolifération et la différenciation. Elles sont essentielles pour répondre aux forces externes et pour réguler les fonctions cellulaires. Plusieurs études sur une variété de pathologies, utilisant des techniques expérimentales différentes, montrent que les pathologies modifient les fonctions cellulaires (Suresh, 2007; Moeendarbary and Harris, 2014). Par exemple, le cancer est caractérisé par une baisse de la rigidité des cellules (Cross et al., 2008; Lekka et al., 1999) : les cellules cancéreuses ont un module élastique plus petit que des cellules normales. D'autres études, plus récentes, suggèrent que les variations des propriétés viscoélastiques pendant l'invasion tumorale sont une signature possible du potentiel métastatique des cellules cancéreuses (Rother et al., 2014).

Deux approches pour l'étude des propriétés mécaniques des cellules existent : (i) les propriétés mécaniques sont mesurées globalement et la cellule est considérée comme un ensemble, soit (ii) les propriétés mécaniques des composantes structurales des cellules sont étudiées localement. Ce n'est que récemment qu'il est possible de sonder des propriétés micro/nanomécaniques de structures cellulaires (tels que le cytosquelette, le noyau...) et de mesurer leurs distributions, notamment grâce à la microscopie à force atomique, qui se démarque par sa haute résolution spatiale.

Le cytosquelette composé de filaments d'actine, de filaments intermédiaires et de microtubules, est un élément clé de la régulation des propriétés mécaniques. En 1989, Yeung and Evans (1989) observent que les déformations des leucocytes peuvent être décrites par une tension corticale générée par une couche riche en actine sous la membrane plasmique et par les propriétés viscoélastiques du cytosol. Plus récemment, il a été montré que les forces actives générées par le cytosquelette d'actine modifient et contrôlent ses propres propriétés (Koenderink et al., 2009). L'effet de ces forces sur l'organisation du cytosquelette et les propriétés des cellules a été intensément étudié sur différents types cellulaires (Levayer and Lecuit, 2012; Prost et al., 2015), et il a été observé qu'une perturbation de la structure et de la dynamique du cytosquelette d'actine résulte en une baisse de la rigidité des cellules (Rotsch and Radmacher, 2000; Wakatsuki et al., 2001; Martens and Radmacher, 2008).

L'application des concepts mécaniques traditionnels de "solide" et "fluide" pour

étudier la biologie et les problèmes physiologiques fourni des connaissances approfondies sur la mécanique des organes, sur la réponse mécanique des tissus et des articulations et aussi sur la physique des écoulements du sang dans le réseau vasculaire (Fung, 1993; Fredberg and Stamenovic, 1989; Humphrey, 2002). L'approche de la mécanique classique des milieux continus fourni aussi des informations sur la réponse de systèmes microbiologiques aux forces externes. Avec des modifications appropriées, ces approches permettent de modéliser la mécanique des cellules biologiques, des composants subcellulaires, comme le cytosquelette et la membrane, et des systèmes biologiques formés de réseaux moléculaires. La mécanique des milieux continus fourni ainsi un cadre pour quantifier et comprendre les processus biomécaniques sans s'intéresser aux échelles de taille et de temps qui sont pourtant au centre des mécanismes biochimiques au niveau cellulaire et moléculaire.

Durant la dernière décennie, les domaines de la mécanique et physique au niveau des cellules isolées et biomolécules ont fait de grandes avancées. Des outils pour sonder les cellules et molécules dans des environnements *in vitro* appropriés ont été développés (Radmacher et al., 1996; Hessler et al., 2005; Vogel and Sheetz, 2006), et permettent d'imposer et détecter des forces et déplacements à la précision du picoNewton et du nanomètre respectivement. Ces avancées nanotechnologiques sont accompagnées par des progrès en imagerie biologique *in vivo* au niveau moléculaire.

Grâce à tous ces développements, l'étude de la mécanique cellulaire, subcellulaire et moléculaire sur les pathologies humaines (dont le cancer) devient un centre d'intérêt de la recherche scientifique (Suresh, 2007).

Pour pouvoir établir des relations dans le contexte des pathologies humaines, il est nécessaire de faire des études systématiques des propriétés mécaniques des cellules en fonction de la pathologie sous des conditions qui reflètent les phénomènes *in vivo*. Caractériser la mécanique cellulaire est d'autant plus compliqué par le fait que la cellule est un système dynamique dont les caractéristiques chimiques et physiques sont en évolution permanente (Bao and Suresh, 2003; Zhu et al., 2000; Alberts et al., 2002). Les cellules sentent, supportent et génèrent des forces : les cellules du squelette, du coeur et du muscle génèrent des forces contractiles, en réalisant des fonctions essentielles du corps humain (Alberts et al., 2002). Les cellules endothéliales peuvent reconnaître l'amplitude, le type (laminaire ou turbulent) et la durée des cisaillements appliqués (Fisher et al., 2001; Ali and Schumacker, 2002). En retour, elles répondent pour maintenir un endothélium sain ou alors conduire à des pathologies vasculaires dont la thrombose et l'athérosclérose (Wootton and Ku, 1999). Une multitude d'autres exemples montre que les propriétés mécaniques des cellules vivantes sont intimement reliées aux pathologies (Suresh, 2007). Par exemple, l'étude des effets du parasite *Plasmodium falciparum* (qui cause la malaria) sur la déformabilité des cellules sanguines rouges humaines (Mills et al., 2007; Suresh, 2006) montre une variation significative des propriétés mécaniques selon l'état de la cellule. Dans cette étude, des pinces optiques¹ sont utilisées pour obtenir une

1. Méthode décrite dans la section 1.4

relation entre force et déformation de cellules pathologiques sur une gamme de force allant de 1 à 200 pN. Cette relation est couplée à des perturbations de protéines impliquées dans l'élasticité cellulaire (Glenister et al., 2002) pour quantifier les contributions de ces protéines aux propriétés élastiques. Ainsi, grâce à cette étude, il est possible de différencier les cellules pathologiques des cellules normales : les propriétés mécaniques sont marqueurs de la pathologie.

Les cellules vivantes sont dynamiques et leurs structures changent en réponse à la charge mécanique et modéliser le comportement des cellules pose des défis particuliers. La déformation des globules rouges est traditionnellement étudié avec des modèles de mécanique de physique basés sur la minimisation de l'énergie (Hochmuth, 1987). Cependant, pour la plupart des cellules vivantes, les modèles de déformation doivent prendre en compte la structure interne, l'hétérogénéité et l'activité des constituants de la cellule.

Les mesures de rigidité cellulaire couvrent une grande gamme allant de la centaine à plusieurs milliers de Pa. Cette variabilité est liée aux propriétés changeantes des constituants et à l'utilisation de différents types de méthodes micro-rhéologiques. Le type de déformation, la taille de la sonde et le temps pendant lequel la déformation est appliquée varient avec la méthode utilisée (Janmey and McCulloch, 2007). Cette grande variété de méthodes expérimentales résulte en une grande variété de résultats ce qui rend la compréhension de la mécanique cellulaire très complexe.

1.1.2 L'influence de l'environnement

La nature mécanique du micro-environnement cellulaire est reconnue comme étant une clé déterminante dans beaucoup de processus développementaux, physiologiques et pathologiques (Geiger et al., 2009; Gomez et al., 2011; Liu et al., 2010; Wang et al., 1993). Les cellules adhèrent *in vivo* sur une matrice extracellulaire déformable (MEC ou ECM) qui est un support mécanique et une source de forces appliquées (Calderwood et al., 1999; Bear et al., 2002; Galbraith et al., 2007). Les cellules détectent, interprètent et répondent aux signaux mécaniques grâce à un processus encore mal compris : la mécanotransduction (Tadokoro et al., 2003; Choi et al., 2008).

Les cellules sont exposées et répondent à une grande variété de contraintes *in vivo* (Bao and Suresh, 2003; Janmey and Miller, 2011; Buxboim et al., 2010; Bershadsky et al., 2006). Elles sont capables de se déformer rapidement ce qui entraîne des changements conséquents au niveau biochimique. Elles "ressentent" les cellules avoisinantes, et elles répondent aux changements de la matrice extracellulaire. La réponse aux stimuli externes est complexe : elle dépend de l'amplitude (Guolla et al., 2012) et la vitesse à laquelle sont appliquées les contraintes (Pravincumar et al., 2012). Des forces internes générées à partir de moteurs moléculaires (Veigel and Schmidt, 2011) et la polymérisation de l'actine (Chaudhuri and Fletcher, 2010; Ji

et al., 2008) sont transmises au substrat afin de faciliter la migration (Ananthakrishnan and Ehrlicher, 2007), la mitose (Lafaurie-Janvore et al., 2013) et communiquer avec les cellules avoisinantes (Reinhart-King et al., 2008). Ceci est le principe de la mécanotransduction : la cellule est constamment en train de ressentir, transmettre et répondre aux changements externes. Ce processus est essentiel pour le maintien du fonctionnement et le développement de cellules normales. Mais avant d'essayer de comprendre comment la cellule "ressent" l'environnement, il est essentiel de comprendre la mécanique de la cellule, c'est-à-dire comment elle se déforme et récupère d'une perturbation physique.

La cellule vivante est un système complexe dynamique qui est sous remodelage constant pour s'adapter aux conditions environnementales. Les changements mécaniques dans la cellule sous conditions normales et en réponse à des signaux externes sont extrêmement difficiles à mesurer *in vitro*.

Les cellules eucaryotes peuvent s'arranger en structure (comme les tissus) qui les protègent de l'environnement. Mais les cellules isolées parviennent aussi à supporter une contrainte mécanique et maintenir une intégrité.

Dans le corps, les cellules sont intégrées dans des tissus conjonctifs solides qui forment des matrices de protéines, et peuvent sentir et répondre aux forces appliquées qui sont très différentes d'une cellule à l'autre, comme par exemple, les cellules sanguines ou les cellules endothéliales (Tzima et al., 2005). Les cellules s'adaptent donc mécaniquement aux propriétés de la matrice. La matrice extracellulaire (ECM) stabilise mécaniquement les tissus soumis aux forces externes, une propriété qui permet aux organes de maintenir leur forme. Les matrices des tissus conjonctifs sont constituées principalement de fibres de collagène et une grande variété de protéines fibrillaires et globulaires, comme la fibronectine, les laminines, les glycosaminoglycanes et la tenascine. Les fibres de collagène sont les protéines les plus abondantes chez les mammifères (Pérez-Tamayo, 1978) et dans les tissus conjonctifs mous, elles permettent de transmettre les forces aux fibroblastes et autres types cellulaires grâce à des récepteurs de collagène appropriés (Provenzano and Vanderby, 2006).

Les cellules et la matrice extracellulaire s'influencent mutuellement en modifiant leurs propriétés mécaniques : les cellules contribuent à la synthèse, dégradation et remodelage de l'ECM (Ozaki et al., 2005; Jordan et al., 2010) et les propriétés mécaniques de l'ECM influencent la morphologie et les fonctions des cellules (Hinz and Gabbiani, 2003). Par exemple, des fibroblastes dans un treillis de collagène sous contrainte mécanique possèdent un phénotype qui enclenche la synthèse de tissu conjonctif tout en inhibant la dégradation de la matrice (Kessler et al., 2001). Ainsi l'ECM transmet les forces mécaniques mais sa structure et sa composition sont aussi influencées par la réponse cellulaire à ces mêmes forces.

Les forces locales et la géométrie de l'environnement régulent les fonctions cellulaires (Vogel and Sheetz, 2006). Les cellules vivantes, isolées ou non, sont constamment sollicitées par des contraintes mécaniques de leur environnement externe. Pour ceci, les cellules ont développé des mécanismes d'adaptation pour maintenir

leur homéostasie.

Récemment, des études font l'observation que les propriétés physiques du microenvironnement peuvent affecter la forme cellulaire et le comportement, notamment l'étude des cellules embryonnaires cultivées sur des substrats de rigidité différente (Janmey et al., 2009). En particulier, il est montré que les interactions avec l'environnement (ECM ou cellules-cellules) peuvent être à l'origine de changements durables au cours de la vie de la cellule. Plusieurs études montrent l'importance des signaux physiques dans l'organisation des tissus pendant le développement embryonnaire. Par exemple, il a été observé que l'orientation de la division cellulaire est dépendante de la distribution spatiale des protéines de l'ECM, en utilisant l'impression micro-contact de motifs de protéines d'adhésion (Théry et al., 2005). De plus, les propriétés mécaniques des cellules contribuent aussi à l'organisation dans les tissus. La prolifération cellulaire peut être affectée lorsque des forces externes sont appliquées au tissu (Cheng et al., 2009). Quand les propriétés mécaniques des tissus sont perturbées, les effets peuvent être considérables. Dans les couches épithéliales, une rigidité modifiée des tissus perturbe la morphogénèse et entraîne les cellules épithéliales vers un phénotype malin (Paszek et al., 2005). Par ailleurs, il apparaît que la rigidité des substrats est importante pour que les cellules embryonnaires puissent se différencier correctement (Engler et al., 2006; Saha et al., 2008).

Avant de discuter des résultats sur les propriétés mécaniques plus en détails, il est important de bien définir les grandeurs physiques de microrhéologie utilisées dans notre étude.

1.1.3 La viscoélasticité de la cellule

Les propriétés rhéologiques jouent un rôle essentiel dans les processus biologiques (Janmey, 1998; Hoffman and Crocker, 2009). Quantifier ces propriétés mécaniques est nécessaire pour pouvoir en tirer des caractérisations, des lois de comportement et des éléments de comparaison. Mettre en évidence ces propriétés pour la cellule est relativement complexe puisque la cellule n'est pas un matériau inerte ou homogène mais c'est un système dynamique hors équilibre et inhomogène. Néanmoins, pour des temps courts de mesure (moins de quelques minutes), la cellule est considérée comme un matériau inerte et homogène (Heidemann and Wirtz, 2004).

1.1.3.1 Notions de viscoélasticité

L'étude des déformations et écoulements des matériaux en réponse aux forces appliquées, est un centre d'intérêt qui trouve son origine dès le 19^{ème} siècle avec Kelvin et Maxwell. La rhéologie, la science de l'écoulement (rheos = qui coule, logie = science de), permet de déterminer les propriétés mécaniques d'un matériau. Ces propriétés décrivent la déformation d'un matériau en réponse à une contrainte appliquée, et comment cette déformation évolue dans le temps (Morrison (2001), Verdier et al. (2009)). Les grandeurs utilisées pour définir les comportements mé-

caniques d'un matériau sous contrainte sont représentées sur la figure 1.1.

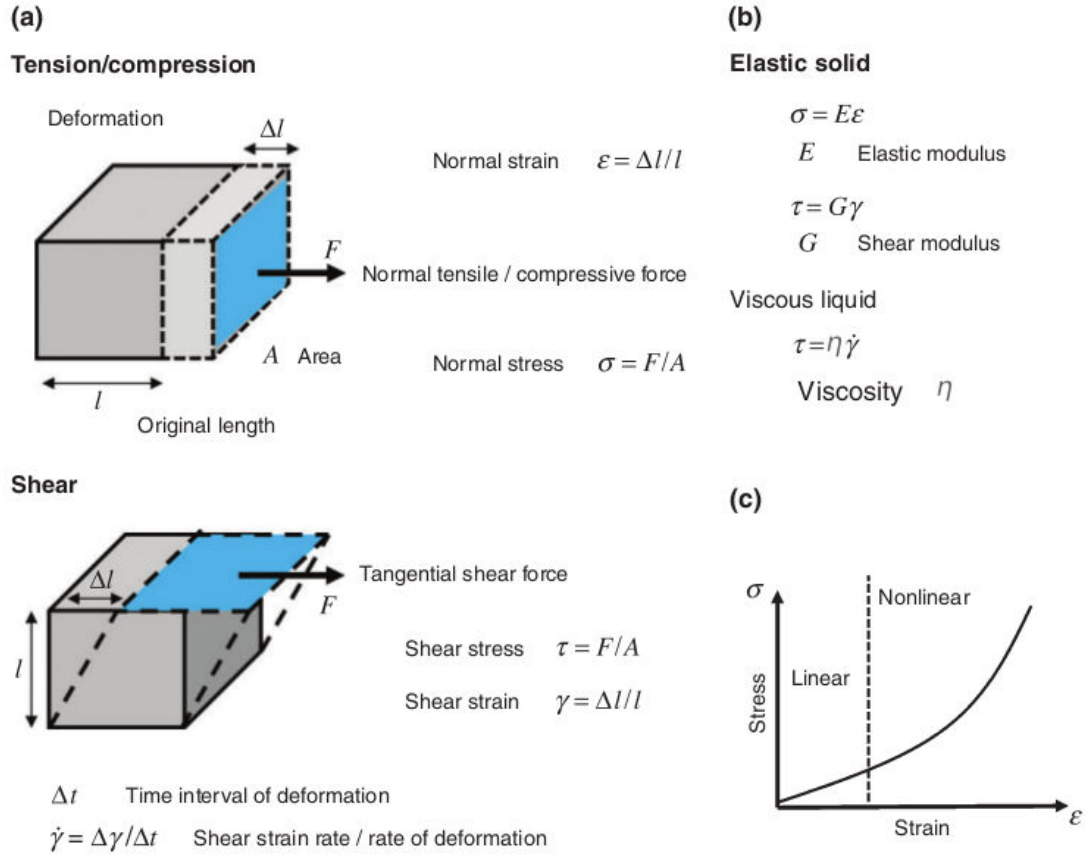


FIGURE 1.1 – (a) La contrainte et le déplacement sont définis comme une force par unité de surface et déformation par unité de longueur respectivement. Les matériaux se déforment sous l'action de forces de compression, d'extension et de cisaillement (shear). (b) La relation entre contrainte et déformation définit les propriétés mécaniques statiques du matériau. (c) Pour les matériaux mous, dont les cellules, la déformation est proportionnelle à la contrainte pour les petites déformations. Pour des grandes déformations, la relation est non-linéaire (Moeendarbary and Harris, 2014).

Le rapport entre la contrainte appliquée et la déformation résultante d'un matériau solide purement élastique est le module d'Young E (souvent décrit comme l'élasticité du matériau dont l'unité est le pascal (Pa)). Cette constante est une propriété fondamentale puisqu'elle détermine la capacité du matériau à garder sa forme sous des contraintes mécaniques (Fig. 1.2) : $\sigma = E\epsilon$, avec σ en Pa et ϵ sans dimension ($\epsilon = \delta l / l_0$ où l_0 est la longueur initiale du matériau et $\delta l = l - l_0$ sa variation de longueur). Contrairement aux solides élastiques, les fluides s'écoulent sous l'application d'une contrainte et ne sont pas capables d'emmagasiner de l'énergie élastique. Le taux auquel le fluide s'écoule $\dot{\epsilon}$ sous une charge donnée détermine sa viscosité η (dont l'unité est en Pa.s) (Fig. 1.2) : $\sigma = \eta \dot{\epsilon}$. La cellule est considérée incompressible aux temps courts.

Les matériaux viscoélastiques sont les matériaux qui exhibent des propriétés élas-

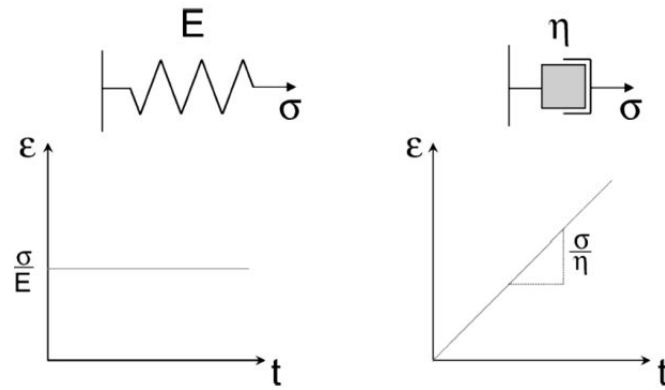


FIGURE 1.2 – Représentation de la déformation d'un solide élastique (gauche) et d'un fluide visqueux (droite) en réponse à une contrainte constante σ .

tiques et visqueuses, et lorsqu'ils sont soumis à des déformations, ils emmagasinent et dissipent simultanément de l'énergie mécanique. Leur rigidité (leur résistance à des déformations solides et écoulements) dépend des paramètres de mesure (taux de déformation, vitesse, charge, etc). Ceci est un phénomène particulier car il n'est pas observé avec des liquides ordinaires ou des solides. L'eau a toujours la même viscosité et un ressort aura toujours la même rigidité selon que nous tirons dessus rapidement ou lentement. Cependant les matériaux viscoélastiques montrent différentes viscosité et élasticité selon la vitesse, l'amplitude et la force de la mesure. Ceci peut être lié à la taille des chaînes, la concentration et le taux de réticulation s'il s'agit de polymères constituant le matériau.

En général, les modèles viscoélastiques linéaires sont basés sur deux éléments : un ressort et un amortisseur. Le ressort suit une loi de Hooke et le second élément est newtonien. Un ressort et un amortisseur en série constituent le modèle de Maxwell (Fig.1.3). Le modèle de Maxwell permet de modéliser simplement la réponse des matériaux.

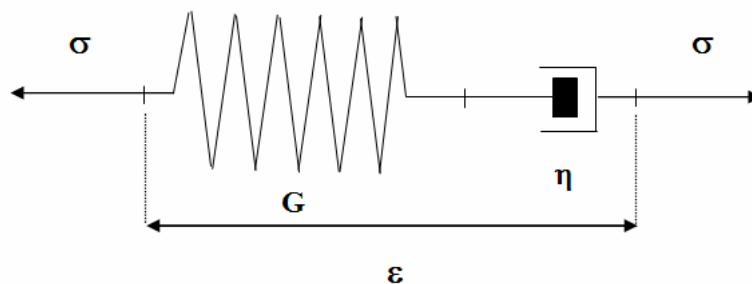


FIGURE 1.3 – Modèle de Maxwell : un ressort (rigidité G , déformation ϵ_1 , contrainte $\sigma = G\epsilon_1$) et un amortisseur (viscosité η , déformation ϵ_2 , la contrainte $\sigma = \eta\dot{\epsilon}_2$) en série. Source : [Verdier \(2003\)](#).

L'équation associée à ce modèle est déduite en considérant la contribution des différents éléments : le ressort (rigidité G , déformation ϵ_1 , contrainte $\sigma = G\epsilon_1$)

et l'amortisseur (viscosité η , déformation ϵ_2 , contrainte $\sigma = \eta \dot{\epsilon}_2$). La somme des déformations des deux éléments $\epsilon = \epsilon_1 + \epsilon_2$ est reliée à la contrainte totale σ . Ainsi, le modèle de Maxwell est décrit de la façon suivante :

$$\sigma + \lambda \dot{\sigma} = \eta \dot{\epsilon} \quad (1.1)$$

où $\lambda = \eta/G$ est le temps de relaxation (s).

Avec une simple intégration de l'équation 1.1, la contrainte est exprimée en fonction de la déformation :

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^t G e^{-(t-t')/\lambda} \dot{\epsilon}(t') dt' \quad (1.2)$$

On introduit la fonction de kernel $G(t)$ qui est la fonction de relaxation :

$$G(t - t') = G e^{-(t-t')/\lambda} \quad (1.3)$$

Ceci est valable dans le cas où seul un temps de relaxation est donné, mais dans les matériaux dynamiques, il existe plus d'un temps de relaxation. Pour N modes de relaxation discrets (Eq. 1.4), la fonction de relaxation généralisée s'écrit donc (Tschoegel, 1988) :

$$G(t) = \sum_{k=1}^N G_k e^{-t/\lambda_k} \quad (1.4)$$

Pour mesurer les propriétés viscoélastiques, une méthode efficace est d'appliquer une déformation sinusoïdale $\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t)$ avec $\gamma_0 \ll 1$, et de mesurer la contrainte résultante dépendante du temps $\sigma = \sigma_0 \sin(\omega t + \phi)$. En complexe, ces grandeurs s'écrivent :

$$\begin{cases} \gamma^* = \gamma_0 e^{i\omega t} \\ \sigma^* = \sigma_0 e^{i\omega t + \phi} \end{cases} \quad (1.5)$$

Le module complexe s'écrit ainsi :

$$G^*(\omega) = \frac{\sigma^*}{\gamma^*} = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} e^{i\phi} \quad (1.6)$$

où ϕ est la phase.

Le module complexe s'écrit $G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega)$ où la partie réelle $G'(\omega)$ correspond au module élastique (l'énergie conservée) et la partie imaginaire $G''(\omega)$ correspond à la partie visqueuse (l'énergie dissipée par la déformation visqueuse).

La relation entre le module complexe et la fonction de relaxation $G(t)$ est :

$$G^*(\omega)/i\omega = \int_0^\infty G(t) e^{-i\omega t} dt \quad (1.7)$$

Dans le cas du modèle de Maxwell, le module complexe G^* et les modules dy-

namiques G' et G'' sont exprimés de la façon suivante (Fig :1.4) :

$$G^* = G \frac{i\lambda\omega}{1 + i\lambda\omega} \quad (1.8)$$

$$G' = G \frac{\lambda^2\omega^2}{1 + \lambda^2\omega^2} \quad (1.9)$$

$$G'' = G \frac{\lambda\omega}{1 + \lambda^2\omega^2} \quad (1.10)$$

Pour des matériaux qui ont un spectre de temps de relaxation (Eq. 1.4), comme les polymères, le module complexe s'écrit :

$$G^*(\omega) = \sum_{k=1}^N G_k \frac{i\omega \lambda_k}{1 + i\omega \lambda_k} \quad (1.11)$$

La figure Fig. 1.4 représente le comportement des modules G' et G'' en fonction de la pulsation ω dans le cas du modèle de Maxwell ou dans le cas de matériaux viscoélastiques.

1.1.3.2 Application à la cellule vivante

Dans le contexte des cellules vivantes, les propriétés mécaniques décomposées en modules élastiques et visqueux dépendent du temps d'application de la force et peuvent donc être décrites comme viscoélastiques.

Une variété de techniques expérimentales montrent que les cellules ont des caractéristiques élastiques et visqueuses et sont donc bien des matériaux viscoélastiques. Contrairement à la plupart des matériaux conventionnels, les cellules sont non linéaires : leur module élastique dépend de la contrainte appliquée. [Fernández et al. \(2006\)](#) montrent pour la première fois une mesure directe de la non-linéarité élastique des cellules. La cellule est adhérente entre deux plaque des verre, avec une séparation contrôlée pour déformer la cellule et ils mesurent la rigidité en réponse à la variation de déformation quand la cellule est sous tension. Cette étude montre que le module élastique peut varier d'un ordre de grandeur en fonction des contraintes appliquées. Cette caractéristique viscoélastique des cellules est liée à leur structure interne qui est une combinaison d'un contenu liquide important (le cytosol) et de structures intracellulaires rigides (noyau, organelles et réseau d'actine polymérisé).

Le caractère viscoélastique des cellules semble être universel pour tous types cellulaires ([Trepate et al., 2007](#)) et peut être mesuré de différentes manières. La méthode la plus commune est d'appliquer une déformation contrôlée et mesurer la réponse correspondante. En utilisant cette approche simple, les cellules répondent d'abord comme un corps élastique et ensuite relaxent dans le temps. Les modules visqueux et élastique et les temps de relaxation des cellules sont estimés en utilisant cette technique ([Bausch et al., 1998](#)).

Une méthode plus robuste pour déterminer la viscoélasticité des matériaux est

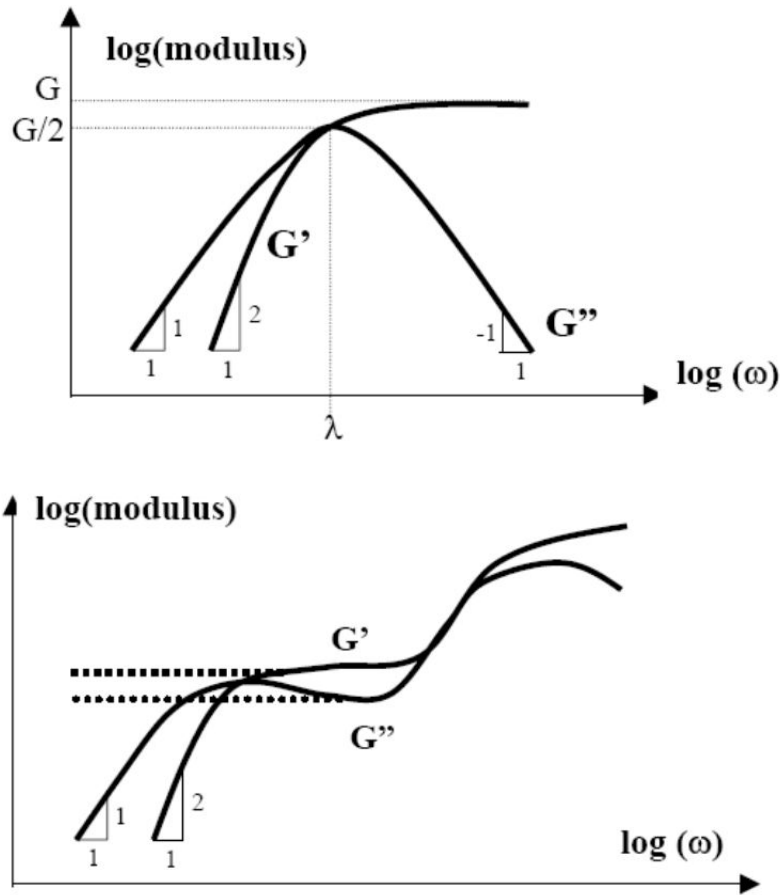


FIGURE 1.4 – Modules de conservation G' et de perte G'' en fonction de ω en log-log. Haut : Modules dans le cas du modèle de Maxwell. Bas : Modules typiques dans le cas de fluides complexes et matériaux viscoélastiques Source : [Verdier \(2003\)](#).

l'application d'oscillations de faibles amplitudes. Les modules élastiques et visqueux ont une réponse qui dépend du taux de déformation : les cellules sont plus rigides quand elles sont sondées à des vitesses plus importantes. En particulier, G' et G'' suivent une loi de puissance faible ([Alcaraz et al., 2003](#); [Trepas et al., 2007](#)). La relation contrainte-déformation de cellules vivantes est linéaire pour des faibles déformations ou pour de faibles forces appliquées. Quand les déformations sont trop importantes, les cellules ont un comportement non-linéaire ce qui se reflète par une rigidité apparente plus importante ([Mahaffy et al., 2000](#); [Rotsch and Radmacher, 2000](#)). Cet effet peut être lié au substrat dur sur lequel reposent les cellules adhérentes. Cependant, des mesures récentes de microscopie à force atomique (AFM) prenant en compte l'épaisseur de la cellule montrent un comportement linéaire grâce à des corrections effectuées de l'effet du substrat ([Mahaffy et al., 2004](#)).

Ce qui ressort de toutes les expérimentations sur les cellules² est la faible valeur de la rigidité. Dans la littérature, la rigidité des cellules varie de quelques dizaines

2. Les méthodes d'expérimentation sont présentées à la section [1.4](#)

de Pa à des dizaines de kPa. Ces variations sont même observées au sein d'un même type cellulaire (Maksym et al., 2000; Puig-De-Morales et al., 2001; Rotsch and Radmacher, 2000). Cette grande variété de valeurs peut être liée à la différence des types cellulaires ou à la structure hétérogène des composants de la cellule. Par exemple, les cellules du squelette sont plus rigides que les cellules endothéliales (Mathur et al., 2001). Quelques techniques pour sonder les propriétés mécaniques peuvent induire une variation locale de la rigidité. Par exemple, l'attachement de billes magnétiques à la surface de la cellule via des récepteurs intégrines induit une réorganisation locale du cytosquelette (Fabry et al., 2001).

L'application d'une contrainte à la cellule a des effets sur sa composition (Gardel et al., 2006), sa taille et son ancrage au cytosquelette (Choquet et al., 1997). Ceci entraîne une modification de la viscoélasticité permettant à la cellule d'adapter sa réponse mécanique globale à l'environnement, pour que ses capacités de migration, d'étalement ou de maintien soient assurées, même en présence d'un changement mécanique externe. La viscoélasticité interne des cellules est modifiée par l'application prolongée de contraintes : par exemple, les contraintes exercées par un flux sur les cellules endothéliales provoquent une augmentation de leur viscosité (Lee et al., 2010).

Il est donc clair que les contraintes imposées sur une cellule influencent ses propriétés mécaniques. Pour mieux comprendre ces mécanismes, il est nécessaire de prendre en compte la structure interne de la cellule qui est composée du noyau, d'un liquide (le cytosol) et un réseau polymérisé, le cytosquelette.

1.2 Les composants cellulaires et leur rôle mécanique

Le cytosquelette est un réseau complexe de biopolymères qui contrôle la forme cellulaire et joue un rôle majeur dans les mécanismes de régulation des forces mécaniques (Bausch and Kroy, 2006; Alberts et al., 2002), ainsi que les processus cellulaires comme la mécanotransduction, la mitose et la migration. La concentration et l'organisation à l'échelle moléculaire du cytosquelette déterminent la réponse mécanique de la cellule à l'environnement chimique et mécanique.

Dans cette partie, une présentation des principaux composants de la cellule et du cytosquelette est donnée, suivie d'une description de la mécanique du cytosquelette et le lien entre son architecture et les propriétés mécaniques des cellules.

1.2.1 La cellule

Le concept de cellule a été énoncé en 1838 par Schwann et Schleiden. La théorie cellulaire postulait que tous les tissus vivants sont composés de cellules et de la matrice extracellulaire. Les cellules eucaryotes sont les composants de base des tissus aux différentes fonctions qui constituent les organismes animaux. Ces unités vivantes

sont complexes dans leur organisation, dynamique et processus (Fig. 1.5).

Une cellule est délimitée par une membrane plasmique et l'intérieur se compose de plusieurs compartiments intracellulaires (organites) entourés de cytosol (phase liquide composée principalement d'eau). Le plus grand compartiment est le noyau qui contient l'information génétique présente sous forme de chromosomes. Le cytoplasme est constitué du reste de la cellule dont le cytosol et les autres organites cellulaires. En particulier, le cytoplasme inclut une architecture de polymères réticulés, le cytosquelette, qui donne à la cellule sa forme et sa résistance mécanique, et est impliqué dans les processus de signalisation.

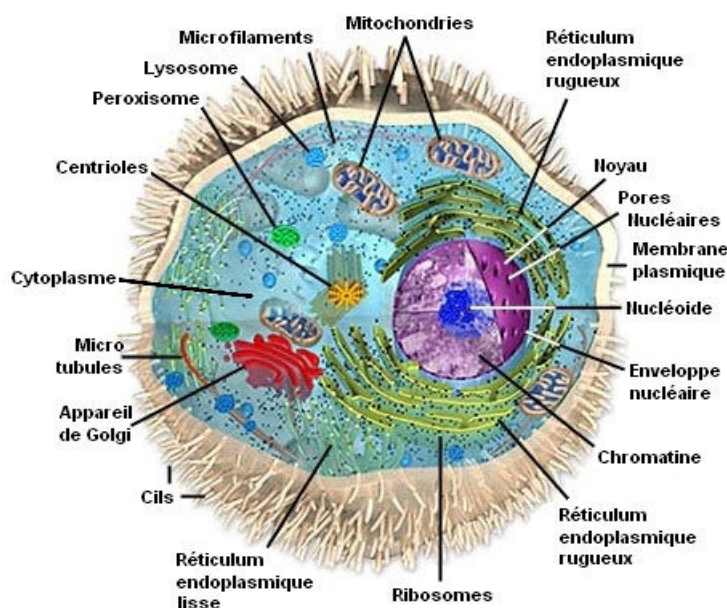


FIGURE 1.5 – Schéma d'une cellule animale. Sont représentés le noyau, les organites principaux et le cytosquelette. D'après Audersirk and Audersirk (1998).

En mécanique de la cellule, la composition de la cellule est simplifiée (Fig. 1.6) et seuls les composants majeurs sont pris en compte. Ce souci de simplification de la cellule se démarque de l'approche du domaine de la biologie cellulaire et moléculaire qui étudient les composants moléculaires en détail, alors que la biomécanique/biophysique se concentre sur des processus globaux. En général, les composants qui sont au centre des recherches sont le noyau, la membrane plasmique, et le cytosquelette.

1.2.2 La membrane plasmique

La membrane plasmique est une bicouche phospholipidique de quelques nanomètres d'épaisseur qui délimite la cellule et est fondamentale pour le fonctionnement de la cellule. C'est une barrière imperméable qui permet de maintenir des gradients de concentration entre le liquide extracellulaire et le cytoplasme intracellulaire. La concentration intracellulaire en ions Ca^{2+} est 10^{-4} fois moins élevée que celle du

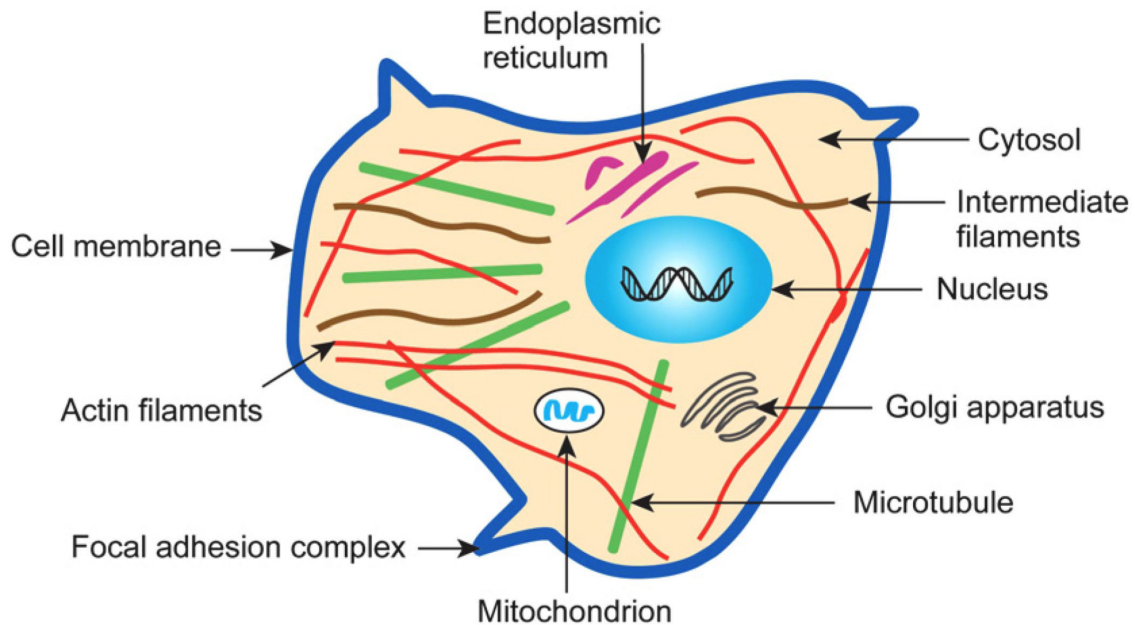


FIGURE 1.6 – Schéma simplifié d'une cellule animale où les trois composants majeurs du cytosquelette (les microtubules, les filaments intermédiaires et l'actine) sont représentés ainsi que le noyau et les organites majeurs de la cellule. D'après (Suresh, 2007)

milieu extracellulaire. La bicouche phospholipidique est constituée de molécules amphiphiles avec des têtes polaires et de queues hydrophobes (Fig. 1.7). Des protéines périphériques s'attachent à la surface des lipides ou s'y enfouissent partiellement, et assurent des fonctions de reconnaissance de signaux biochimiques et d'activation d'autres molécules en réponse à ces signaux. La plupart sont transmembranaires et traversent la membrane de part en part.

Les intégrines, principaux récepteurs des cellules pour interagir avec la matrice extracellulaire et principaux acteurs de la mécanotransduction, sont un exemple de protéines transmembranaires qui régissent le fonctionnement de la cellule (Alberts et al., 2002).

La membrane plasmique est une structure dynamique et fluide dans laquelle les protéines diffusent en deux dimensions. Cette caractéristique fluide de la membrane lui permet de changer de forme facilement. Le coefficient de diffusion des protéines dans la membrane plasmique est de l'ordre de 10^{-12} à $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ selon la composition lipidique de celle-ci (Kusumi et al., 1993; Daumas et al., 2003). Malgré son caractère fluide, la membrane plasmique a quand même une composante élastique qui est liée à l'ancrage du cytosquelette à la membrane. Notamment lors de la migration, la membrane peut former des protusions localisées : les lamellipodes et les filopodes. Le lamellipode est une étendue membranaire de quelques centaines de nanomètres d'épaisseur alors que les filopodes sont des petits tubes de diamètre 200 nm qui s'étendent sur plusieurs micromètres de long. Ces structures sont causées par la polymérisation du cytosquelette d'actine qui pousse la membrane plasmique.

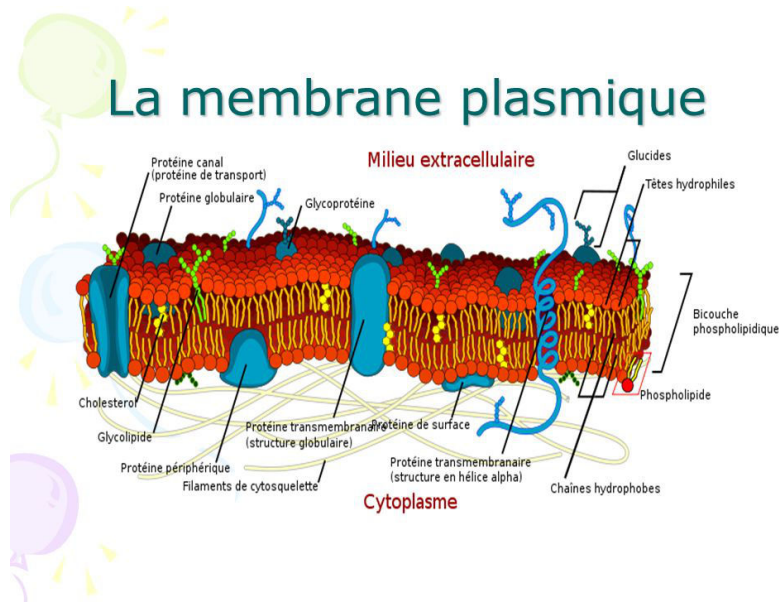


FIGURE 1.7 – Schéma de membrane cellulaire, avec ses composants lipidiques et les protéines enchâssées. La bicouche a une épaisseur de l'ordre de 5 nm. D'après <http://www.jpboiseret.eu>

1.2.3 Le cytosquelette

Le cytosquelette est un réseau dynamique tridimensionnel de polymères (Mofrad, 2006). Il a trois fonctions principales : organiser spatialement le contenu de la cellule ; connecter la cellule physiquement et biochimiquement à l'environnement externe ; et générer des forces coordonnées qui permettent à la cellule de bouger, changer de forme et répondre aux stimuli externes. Pour effectuer ces fonctions, le cytosquelette intègre l'activité d'une multitude de protéines et organelles cytoplasmiques. Malgré le mot 'squelette', le cytosquelette n'est pas une structure fixe dont la fonction est isolée. C'est une structure dynamique et adaptative dont les composants polymériques et les protéines de régulation sont en flux variable.

Les composants du cytosquelette sont en grande partie identifiés et caractérisés intensément *in vitro*, et les chercheurs utilisent maintenant la microscopie avancée pour déterminer, avec une grande précision spatiale et temporelle, la localisation et la dynamique de ces protéines du cytosquelette pendant toutes les étapes de la vie cellulaire.

Le cytosquelette est composé de trois types principaux de polymères : les filaments d'actine, les microtubules et un groupe de polymères connu collectivement sous le nom de filaments intermédiaires (Fig. 1.8). Ensemble ces trois polymères contrôlent la forme et la mécanique des cellules eucaryotes. Ils sont organisés en réseau qui résiste aux déformations, peuvent se réorganiser en réponse aux forces externes appliquées. Ils ont un rôle important dans l'arrangement et le maintien de l'intégrité des compartiments intracellulaires.

Une illustration simple de chaque filament montre la différence majeure de structure entre les trois réseaux (Fig. 1.9) : le filament d'actine est le plus fin avec une

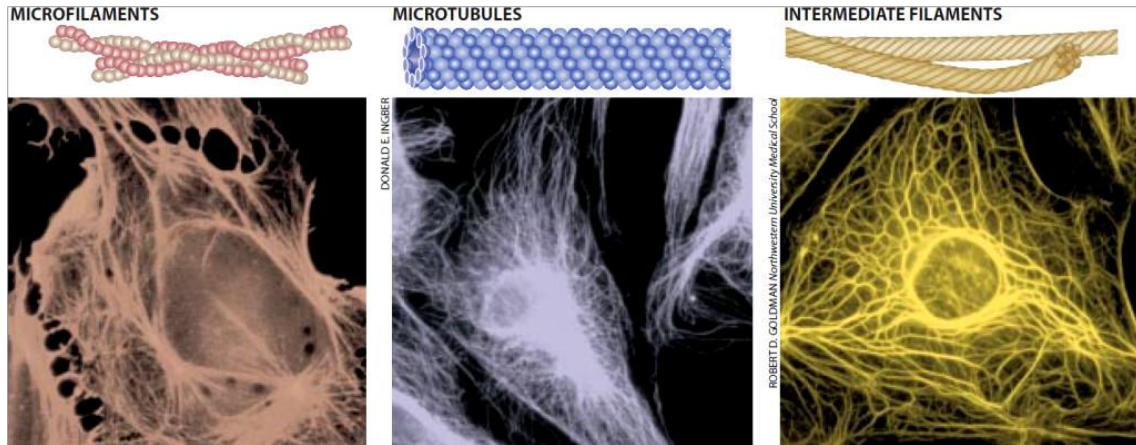


FIGURE 1.8 – Filaments du cytosquelette : de gauche à droite, les filaments d’actine (microfilaments), les microtubules et les filaments intermédiaires (Ingber, 1998)

certainne flexibilité, alors que le filament de microtubule a la forme d’une tige rigide et les filaments intermédiaires sont plus flexibles. Pour quantifier cette flexibilité, on définit la longueur de persistance qui désigne la longueur à partir de laquelle on perd les corrélations d’orientation entre deux points du filament. La flexibilité d’un filament est liée à la rigidité : elle augmente quand la rigidité augmente.

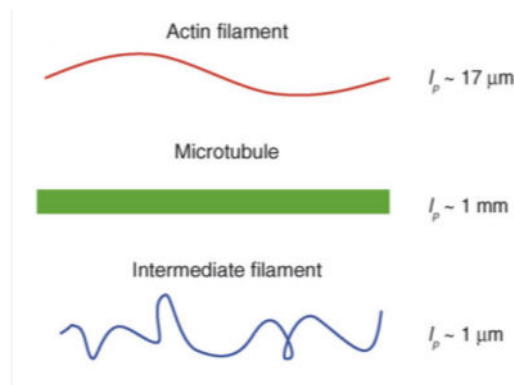


FIGURE 1.9 – Illustration des filaments constituant le cytosquelette : F-actin, microtubules et filaments intermédiaires avec la longueur de persistance l_p respective. (Kasza et al., 2007)

Les différences principales qui distinguent l’architecture et les fonctions des trois réseaux de polymères constituant le cytosquelette sont la rigidité mécanique, la dynamique d’assemblage, la polarité et le type des moteurs moléculaires avec lesquels ils s’associent (Table 1.1). Les informations contenues dans ce tableau illustrent le rôle critique de ces composants du cytosquelette dans la mécanique cellulaire mais aussi les interactions de la cellule avec son environnement externe biochimique.

Les principales caractéristiques des filaments mesurées *in vitro* sont l’énergie de courbure, la longueur de persistance, et le module d’Young. Pour une tige de rayon

Caractéristiques	Microtubules	Filaments d'actine	Filament intermédiaires
Sous-unités protéiques	Tubuline	Actine G	Famille hétérogène de protéines (Kératine, desmine, vimentine)
Diamètre du filament	25 nm	6 – 8 nm	10 nm
Longueur du filament L	0.2 – 25 μm	30 – 100 μm	10 – 20 μm
Polarité	Polarisé (extrémités + et -)	Polarisé (extrémités + et -)	Non polarisé
Modules d'Young (E)	1.9 GPa	1.3–2.5 GPa	1–5 GPa
Module de courbure (K_B)	$2.6 \times 10^{-23} \text{Nm}^2$	$7 \times 10^{-26} \text{Nm}^2$	$4 - 12 \times 10^{-27} \text{Nm}^2$
Longueur de persistance (L_p)	1 mm <i>in vivo</i>	17 μm	1 μm
Moteurs moléculaires : rôle	- Kinésines : Transport axonal (transport de vésicules et division cellulaire). - Dynéines : Mouvement des cils et flagelles.	Myosine dont la myosine II : contractilité	Pas de moteurs moléculaires car non polarisé.

TABLE 1.1 – Propriétés des trois composants du cytosquelette de la cellule : les microtubules, les filaments d'actine et les filaments intermédiaires, synthétisés d'après [Alberts et al. \(2002\)](#) et [Fudge et al. \(2003\)](#)

a , de module élastique E et de moment d'inertie I , l'énergie de courbure s'exprime par $K_B = EI = E\pi a^4/4$ et pour une tige vide avec un rayon externe a_0 et un rayon interne a_1 , $K_B = EI = E\pi(a_0^4 - a_1^4)/4$. La longueur de persistance se calcule par $L_p = K_B/(k_B T)$ où k_B est la constante de Boltzmann et T la température absolue ([Suresh, 2007](#)).

Des défauts dans la structure du cytosquelette influencent des pathologies dont différents types de tumeurs. De même, cibler le cytosquelette pour modifier sa structure et ses fonctions mécaniques et biochimiques peut fournir des pistes pour des traitements du cancer.

1.2.3.1 Les microtubules

Les microtubules sont les fibres les plus rigides des trois composants du cytosquelette et ont la dynamique d'assemblage et désassemblage la plus complexe. La

longueur de persistance des microtubules est tellement importante (~ 5 mm *in vitro* et ~ 1 mm *in vivo*) que des microtubules uniques peuvent former des rails presque linéaires et peuvent flamber sous des charges de compression dans la cellule (Brangwynne et al., 2006). En plus d'être les moins flexibles, les microtubules sont les filaments avec le diamètre le plus large du réseau de cytosquelette, dont la base repose sur des hétérodimères de tubulines α et β . Ces longs cylindres creux et rigides de diamètre 25 nm sont formés de 13 protofilaments composés des deux sous unités de tubuline (Fig. 1.10). La concentration intracellulaire en tubuline est de l'ordre de 20 μ M (Valiron et al., 2001).

Les microtubules peuvent passer d'un état de croissance stable à un état de décroissance rapide (Mitchison and Kirschner, 1984). Cette instabilité dynamique permet au cytosquelette de microtubule de se réorganiser rapidement et permet aux microtubules individuels de sonder l'espace cellulaire rapidement (Holy and Leibler, 1994), environ 1000 fois plus rapidement que des polymères qui ne sont sensibles qu'aux changements de concentration cellulaire des unités ou de l'action des protéines de régulation. Les constantes d'association et de dissociation des dimères sont différentes aux deux extrémités, ce qui rend le filament polarisé. L'extrémité "-" (ancrée au centrosome³ et où la dépolymérisation est prédominante) et l'extrémité "+" (la croissance est la plus grande) sont les deux pôles de ces filaments.

Le réseau de microtubules rayonne en aster autour du centrosome et joue un rôle majeur lors de la mitose (division cellulaire). De nombreuses protéines peuvent se lier aux microtubules (les Microtubule Associated Proteins ou MAP) et aux monomères de tubuline, et modifier la stabilité des filaments (Desai and Mitchison, 1997).

1.2.3.2 Les filaments d'actine

Plus de 150 protéines possèdent des domaines liant le monomère G-actine, qui se polymérisent pour former les filaments d'actine (Machesky et al., 1999).

Le réseau d'actine est l'entité qui joue un rôle clé dans la génération de force dans les cellules. Les filaments d'actine sont moins rigides que les microtubules, avec une longueur de persistance de 17 μ m. Mais la présence de grande concentration de réticulants qui lient les filaments d'actine promeut l'assemblage de structures très organisées et rigides. Les filaments d'actine sont organisés selon trois types d'arrangements : réseaux isotropes, réseaux en paquet⁴ et réseaux en maille. On peut retrouver les réseaux isotropes dans les microvillosités, et les filaments qui les composent sont orientés avec la même polarité. Les paquets de filaments alignés supportent les protusions de filopodes. Les filaments y sont arrangés avec des polarités opposées et sont liés par le dimère α -actinine, et grâce à la myosine II, moteur moléculaire, ils engendrent des forces de contraction. Alors que les réseaux en maille se trouvent principalement dans le lamellipode et dans le réseau sous-membranaire (actine corticale) des cellules en motilité et ils génèrent des forces impliquées dans

3. complexe protéique nucléateur du réseau de microtubules à côté du noyau

4. Un paquet (bundle) de F-actine désigne un regroupement de plusieurs filaments en une entité

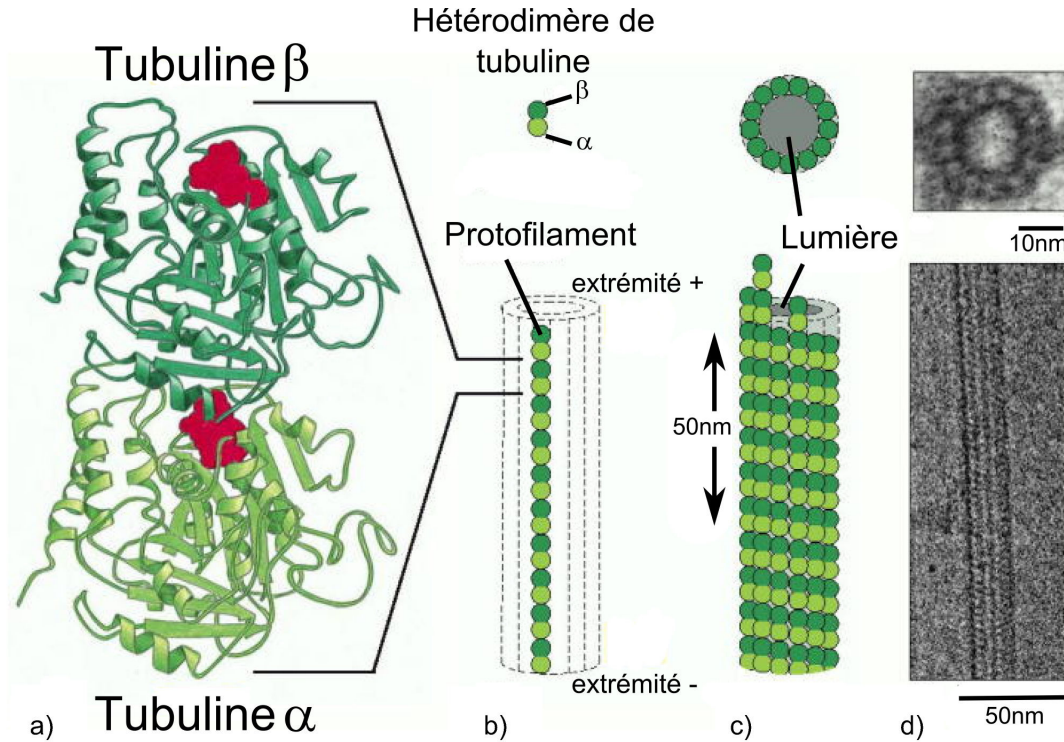


FIGURE 1.10 – Structure d’un microtubule : un dimère d’ α et β tubuline (a) forme un protofilament (b), 13 protofilaments s’assemblent pour former un tube (c); micrographies électroniques d’un microtubule en vue de profil de face (d) ([Alberts et al., 2002](#))

le changement de forme cellulaire. Les filaments y sont organisés en un arrangement relativement lâche avec beaucoup d’interconnexions orthogonales formées par la filamine.

Contrairement aux microtubules, les filaments d’actine ne passent pas d’un état discret de polymérisation et dépolymérisation, mais ils sont constamment en train de s’assembler et se désassembler en réponse à l’activité locale des systèmes de signalisation. Cette élongation régulière est appropriée pour produire des forces contractiles durables nécessaires à l’avancement de l’extrémité des cellules en migration ([Pollard and Borisy, 2003](#)). La polymérisation de l’actine génère une force et pousse la membrane vers l’avant alors que le réseau contenant la myosine II, un moteur moléculaire, génère une force contractile.

Comme les microtubules, les filaments d’actine sont des polymères polaires, les sous-unités sont structurées de façon asymétrique au niveau moléculaire. Cette polarité permet aux filaments de servir de rails pour les moteurs moléculaires qui se déplacent préférentiellement dans une direction.

Les filaments d’actine peuvent effectuer un cycle de polymérisation-dépolymérisation en fonction des conditions physiques ou chimiques de la cellule. Le taux de croissance des filaments ∇c dépend de la concentration en monomère c , selon l’équation $\nabla c = k_{on} \times c - k_{off}$, où k_{on} ($\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et k_{off} (s^{-1}) les constantes d’association et dissociation des monomères d’actine aux deux extrémités du polymère, ainsi la

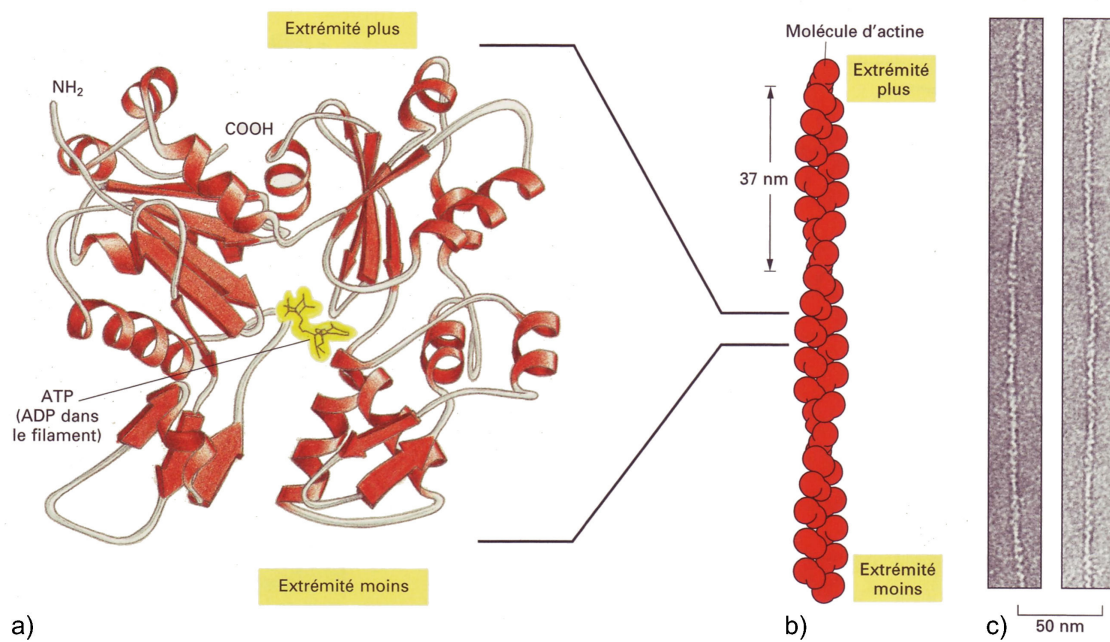


FIGURE 1.11 – Structure d’un filament d’actine : un monomère avec son site de liaison à l’ATP (A) polymérise pour former un filament (B); et micrographies électroniques de filaments (C). D’après (Alberts et al., 2002)

longueur d’équilibre est au dessus de la concentration critique. En présence d’ATP, les taux de vitesse d’assemblage et désassemblage sont différents pour les deux bouts de ces filaments polaires. L’hydrolyse d’ATP peut causer la croissance à un bout et une dépolymérisation simultanée à l’autre bout. Ce phénomène est connu sous le nom de *treadmilling*, qui génère un mouvement relatif des monomères d’actine d’un bout à l’autre.

Le contrôle de la dynamique de polymérisation est critique pour la capacité du cytosquelette d’actine à se réorganiser rapidement en réponse à un signal mécanique ou chimique. Il est possible d’inhiber la polymérisation des filaments en utilisant des toxines ou drogues comme la LatrunculinA, qui va se lier aux monomères d’actine, ce qui empêche la polymérisation et favorise ainsi la dépolymérisation.

Pour évaluer de façon quantitative la contribution de la F-actine aux mécaniques du cytosquelette, ces réseaux ont été reconstitués *in vitro* avec des protéines purifiées. Ainsi la taille des mailles d’un gel de F-actine reconstitué dépend de la concentration en F-actine (Schmidt et al., 1989). Sous une contrainte appliquée faible, les réseaux semi-flexibles se déforment de façon proportionnelle à la charge, mais sous des contraintes plus grandes, la déformation est non-linéaire et il y a une augmentation de la rigidité avec la déformation (Mackintosh et al., 1995). Ce comportement est typique pour les matériaux biologiques.

Le caractère très dynamique du réseau d’actine, avec des filaments en constante réorganisation (via la polymérisation/dépolymérisation, l’action des différentes protéines de réticulation...) en fait le candidat idéal pour expliquer la plupart des

phénomènes dynamiques qu'exhibent les cellules. Des études récentes (Gardel et al., 2004; Storm et al., 2005; Gardel et al., 2006) montrent qu'il existe deux régimes d'élasticité. Le premier d'origine enthalpique, est rencontré pour de faibles concentrations en réticulant : les points de réticulation du réseau sont très espacés, les filaments subissent la contrainte indépendamment les uns des autres et flambent pour supporter le stress. En revanche, pour un réseau réticulé dense, le second régime est gouverné par une élasticité entropique. Les déformations induites par la contrainte se répartissent uniformément dans le réseau. Chaudhuri et al. (2007) ont observé ces deux régimes au sein d'un même gel en fonction de la contrainte imposée (Fig. 1.12).

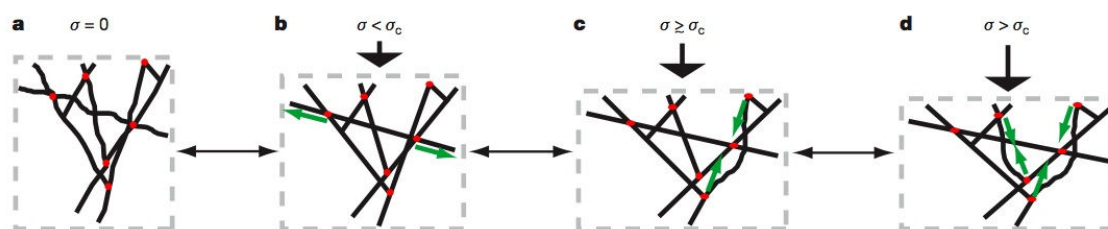


FIGURE 1.12 – La contrainte est représentée par la flèche noire au-dessus des vignettes ; a,b : Pour une contrainte $0 \leq \sigma < \sigma_c$ le gel est étiré latéralement, l'élasticité entropique est augmentée. c,d : Pour une contrainte $\sigma > \sigma_c$, les filaments flambent et ces derniers ne contribuent plus à l'élasticité du réseau (Chaudhuri et al., 2007)

1.2.3.3 Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont des cylindres non polarisés de diamètre ~ 10 nm (Renner et al., 1981; Zackroff and Goldman, 1979), d'où leur nom "intermédiaires" car leur diamètre apparent est compris entre celui des filaments d'actine et les microtubules. Ces filaments sont les moins rigides parmi les trois composants du cytosquelette, avec une longueur de persistance de 1 μm , et ils résistent aux forces d'étirement beaucoup plus efficacement qu'aux forces de compression. Les filaments sont très extensibles en comparaison avec les filaments d'actine et de microtubules, et ainsi résistent aux contraintes mécaniques importantes tout en gardant leur structure filamentueuse intacte (Janmey, 1998; Fudge et al., 2003). Cette grande résistance leur confère un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité mécanique des cellules.

Les filaments intermédiaires sont formés à partir de groupes de protéines d'une famille comptant plus de 50 membres. Six groupes distincts sont distingués parmi lesquels la kératine, la vimentine, la lamine et la nestine. Les molécules allongées s'enroulent d'abord sous forme de dimères, qui eux-mêmes s'assemblent de façon anti-parallèle en tétramères, et finalement donnent les fibres finales (Fig. 1.13). Les filaments intermédiaires peuvent aussi se réticuler avec des protéines appelées les plectines (Wiche, 1998) et quelques structures de filaments intermédiaires peuvent être organisées principalement à travers les interactions avec les microtubules et filaments d'actine.

Beaucoup de types cellulaires forment des filaments intermédiaires en réponse aux contraintes mécaniques, comme par exemple les cellules épithéliales des poumons, dans lequel les filaments intermédiaires de kératine forment un réseau qui aide les cellules à résister aux contraintes de cisaillement (Flitney et al., 2009). Une classe de filaments intermédiaires de lamines contribue à l'intégrité mécanique des noyaux (Tsai et al., 2006).

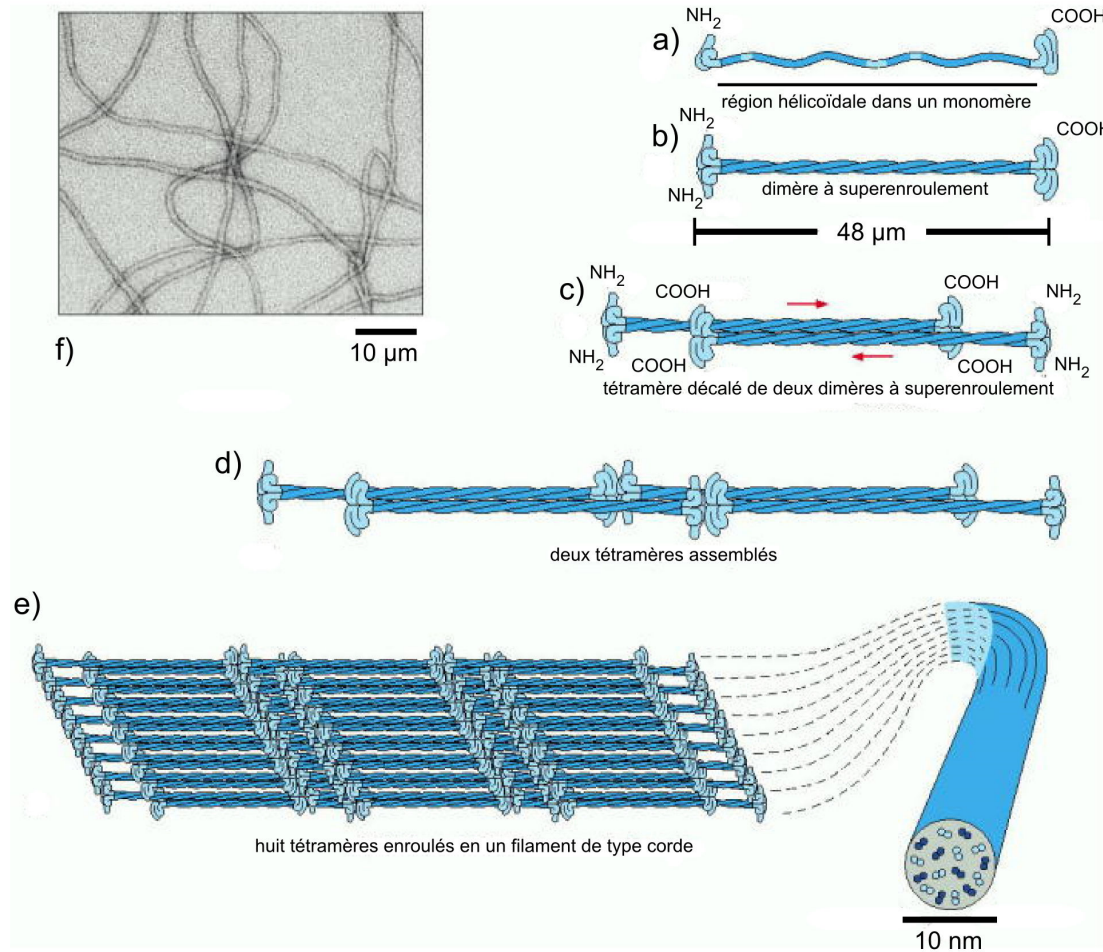


FIGURE 1.13 – Structure d'un filament intermédiaire : deux monomères (a) forment un dimère à superenroulement (b)/ Deux dimères s'alignent côte à côte pour former un tétramère antiparallèle (c) qui s'assemblent à un autre tétramère (d). Huit tétramères forment un filament de type corde (e) de diamètre 10 nm. (f) Filament intermédiaire vu au microscope électronique (Alberts et al., 2002).

Ces filaments sont peu dynamiques sauf au moment de la division cellulaire où ils se réorganisent fortement. Ce sont les structures les plus stables du cytosquelette et une très faible fraction de molécules reste sous forme monomérique dans le cytoplasme. Contrairement aux microtubules et F-actine, les filaments intermédiaires ne sont pas polarisés et ne peuvent pas servir de support pour les déplacements de moteurs moléculaires.

1.2.3.4 Les moteurs moléculaires et la contractilité

Les moteurs moléculaires associés aux filaments d'actine et microtubules ont la capacité de générer des forces et d'effectuer des déplacements sur les filaments polaires. Ces moteurs moléculaires ont un rôle essentiel dans l'organisation des cytosquelettes de microtubule et d'actine. Ils consomment de l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP en ADP, permettant ainsi d'effectuer du travail mécanique (dans le cas des microtubules, c'est du GTP). Ils transportent des vésicules et autres organelles à l'intérieur de la cellule, et contrôlent la forme de la cellule, la division et autres fonctions mécaniques du fait de leur capacité à générer des forces mécaniques. Il y a trois types principaux de moteurs moléculaires : les myosines, les kinésines et les dynéines.

La famille des myosines, associée à l'actine

Ces molécules sont spécialisées dans le travail unidirectionnel sur les filaments d'actine et peuvent générer des contraintes dans le réseau d'actine. Il existe deux grandes classes de myosines : les myosines I, dont la fonction est de déplacer des vésicules le long des filaments, et les myosines II, qui peuvent faire glisser les filaments d'actine les uns par rapport aux autres. La myosine-II joue un rôle mécanique important car elle peut causer les contractions musculaires. Ce sont donc les myosines II auxquelles nous nous intéresserons par la suite, pour leur rôle dans la contractilité cellulaire. La myosine-II peut être inhibée avec des drogues comme la Blebbistatin, et la contractilité acto-myosine peut être inhibée avec la drogue Y27632.

Les kinésines et les dynéines, associées aux microtubules

Les protéines associées aux microtubules, les kinésines et dynéines, génèrent des mouvements dans le sens + et - respectivement. Elles sont responsables du transport cellulaire et jouent un rôle crucial dans l'organisation des microtubules lors des étapes de la division cellulaire (interphase et mitose). Ces moteurs transportent aussi des protéines entre les compartiments intracellulaires grâce aux rails formés par les microtubules.

La contractilité du complexe acto-myosine

Les complexes acto-myosines sont formés par l'association des moteurs de myosines et des filaments d'actine. La myosine-II s'assemble sous forme de chaînes bipolaires courtes qui s'attachent aux filaments d'actine proches pour produire un mouvement relatif. Ces complexes ont des propriétés remarquables pour générer des contraintes actives dans le réseau d'actine (Fig 1.14d). Les complexes acto-myosines peuvent s'organiser en fibres de stress ou en myofibrilles qui consistent en des fibres (bundles) contractiles de filaments d'actine et moteurs moléculaires. Dans d'autres cas, ils peuvent aussi exister en tant que réseau aléatoire d'un gel actif très réticulé avec des dimensions de l'ordre de 100 nm. C'est le cas du cortex d'actine qui forme une couche fine (environ 1µm) sous la membrane plasmique de la plupart des cellules eucary-

otes. La myosine II est un dimère : elle contient une queue en bâtonnets enroulés, et deux têtes identiques, possédant une fonction ATPase et une activité motrice. Les chaînes légères présentes au niveau des têtes (Myosin Light Chain, ou MLC) doivent d'abord être activées par phosphorylation, pour que chaque tête de myosine puisse se fixer à un filament d'actine. Une fois fixée, la tête de myosine peut se lier à une molécule d'ATP, ce qui l'éloigne temporairement du filament, puis hydrolyser l'ATP, en changeant sa conformation ce qui provoque un déplacement vers l'avant, puis relâcher la molécule de phosphate, ce qui lui permet de se refixer sur le filament ; et enfin générer une force, en expulsant l'ADP restant. La progression des têtes de deux myosines attachées entre elles sur chacun des filaments va les faire coulisser l'un par rapport à l'autre. C'est par ce mécanisme que les myosines II génèrent des forces contractiles dans les cellules.

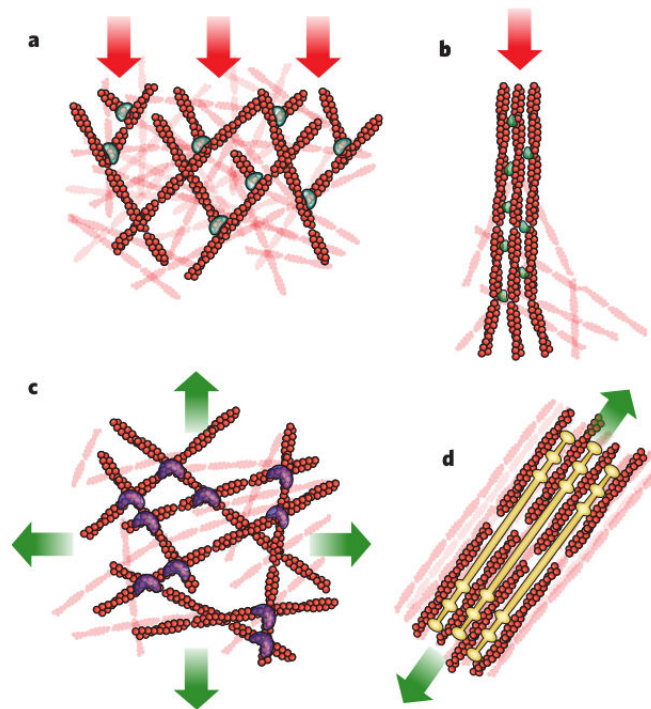


FIGURE 1.14 – Structures du cytosquelette en fonction des forces cellulaires. Le cytosquelette d'actine forme des structures qui ont une grande variété d'architecture associée aux différents types de forces cellulaires (les flèches rouges sont les forces de compression ; les flèches vertes sont les forces d'extension). **a** Les réseaux d'actine en maille pousse la membrane plasmique et génèrent des protusions. **b** Les fibres de filanets (bundles) forment des filopodes qui génèrent des forces de protrusion . **c** L'actine corticale, qui est réticulé par des protéines de filamine, supporte la tension dans plusieurs directions. **d** Fibrilles de stress formées par des fibres (bundles) associées à des myosines pour générer des tensions en réponse à la matrice extracellulaire. Source : (Fletcher and Mullins, 2010)

Les complexes acto-myosines confèrent des propriétés viscoélastiques remarquables

à la cellule.

Des protéines régulatrices (thymosines, profiline, cofiline, gelsoline) et des ions (calcium) sont aussi responsables du contrôle de la dynamique d'assemblage-désassemblage des filaments et de l'activité des protéines motrices. Mais nous ne rentrerons pas dans les détails de ces protéines.

1.2.4 La mécanique du cytosquelette

Bien que chaque composant du cytosquelette se distingue par ses propriétés et fonctions spécifiques, les réseaux sont liés entre eux de façon complexe. L'organisation de ces liens et l'architecture résultante du cytosquelette ont un rôle central dans la transmission des contraintes de compression et d'étirement et pour sentir le microenvironnement mécanique (Janmey and McCulloch, 2007). Malgré leur interconnection, les réseaux du cytosquelette sont étudiés séparément et individuellement pour comprendre leurs contributions à la mécanique cellulaire.

Les réponses mécaniques de gels formés à partir de filaments de cytosquelette purifiés reconstitués *in vitro* fournissent une connaissance approfondie de ces polymères intracellulaires. Un des avantages des réseaux reconstitués est que leurs propriétés viscoélastiques peuvent être sondées par des approches traditionnelles d'ingénierie (Bausch and Kroy, 2006) couplées à des méthodes novatrices d'optique. En mesurant la réponse cellulaire dépendante du temps à une contrainte ou déformation imposée, les propriétés élastiques et visqueuses peuvent être déterminées.

Filaments d'actine

Les réseaux de filaments d'actine sont d'intérêt majeur à cause de la variété des réseaux qu'ils forment et ils se comportent comme des modèles de polymères semi-flexibles (Mackintosh et al., 1995).

Pour la plupart des matériaux élastiques, la constante élastique est indépendante de la contrainte appliquée dans une gamme de déformation restreinte. Au contraire, les réseaux semi-flexibles exhibent une propriété inhabituelle : le module élastique augmente quand la contrainte appliquée augmente (Storm et al., 2005). Tous les polymères qu'ils soient d'origine biologique ou non, sont caractérisés par leur longueur de persistance L_p . La longueur de persistance est définie comme la longueur moyenne du polymère au delà de laquelle, à cause des fluctuations thermiques, les orientations de ses deux extrémités ne sont plus corrélées entre elles. La longueur de persistance doit être mise en relation avec la longueur moyenne L des filaments du polymère. Les polymères sont dit flexibles si $L \gg L_p$. L'élasticité du polymère est alors de nature entropique, c'est-à-dire que sa résistance à l'extension ou à la compression est déterminée par le nombre de configurations accessibles au filament considéré comme une chaîne entropique. Ce type de polymère ne devient rigide que dans les cas de fortes extensions, où le nombre de configurations accessibles à la chaîne est très limité. À l'inverse, les polymères sont dits rigides si $L \ll L_p$. L'élasticité du polymère est alors de nature enthalpique, c'est-à-dire

que sa résistance à l'extension ou la compression est déterminée par le module de courbure du polymère $K_B = L_p k_B T$.

Pour les filaments d'actine, la longueur de persistance est du même ordre de grandeur que la longueur des filaments dans la cellule, donc les filaments d'actine ont une élasticité à la fois de nature enthalpique et entropique, et on parle de polymères semi-flexibles. Les filaments sont suffisamment mous pour avoir des fluctuations thermiques de conformation qui jouent un rôle important dans l'élasticité. Les effets des fluctuations thermiques sont notamment apparents aux temps petits (Koenderink et al., 2006). L'importance de ces deux contributions élastiques dépend de l'architecture du réseau.

L'élasticité des réseaux réticulés a une origine physique différente et dépend de la concentration en actine et en réticulant (Gardel et al., 2004). Des mesures rhéologiques *in vitro* de réseaux d'actine réticulés avec la filamine montre qu'il y a une augmentation dramatique de la constante élastique avec la pré-contrainte imposée, comparable avec les valeurs mesurées sur les cellules. Ceci suggère que la pré-contrainte dans les cellules joue un rôle important dans les propriétés élastiques (Gardel et al., 2006).

L'augmentation de la rigidité avec la contrainte dans les réseaux de biopolymères a des implications importantes : l'amplitude de leur élasticité linéaire est inférieure de plusieurs ordres à celle des cellules. Cependant, quand les cellules sont pré-contraintes dans le régime non-linéaire, l'élasticité de ces réseaux augmente et se rapproche de celle des cellules (Gardel et al., 2006). Ceci suggère que les cellules sont pré-contraintes, notamment du fait de la présence des moteurs moléculaires (comme la myosine II) attachés à l'actine.

Filaments intermédiaires

Les propriétés mécaniques des filaments intermédiaires sont mises en évidence en effectuant des expériences classiques sur des échantillons homogènes et isotropes, ce qui permet de relier le module élastique à la taille moyenne de la maille du cytosquelette (Mackintosh et al., 1995). Ceci veut dire que la réponse viscoélastique du réseau dépend de l'organisation subcellulaire, de la composition filamenteuse et de la concentration en protéine.

Microtubules

Des expériences faites sur des gels et des réseaux réticulés de microtubules montrent que ces filaments ont la rigidité de courbure la plus grande parmi tous les composants du cytosquelette. Ainsi, l'élasticité domine quand les microtubules sont déformés sous une force externe. Sous une contrainte externe faible, la rigidité du réseau de microtubule a une réponse élastique linéaire en fonction de la concentration en unité de microtubulines (Yang et al., 2012), ce qui relie le taux de polymérisation des microtubules et la longueur finale des filaments (Janson and Dogterom, 2004; Pampaloni et al., 2006). La viscoélasticité des microtubules dépend aussi des interac-

tions intermoléculaires entre les dimères de tubuline, mais les interactions latérales et longitudinales sur les microtubules ne contribuent pas de la même façon à la réponse mécanique. Des études sur la mécanique de microtubules isolés suggèrent que leur rigidité de courbure est affectée par des déplacements internes des sous-unités de tubuline (Pampaloni et al., 2006). Comment ceci affecte le réseau de microtubules n'est pas encore très compris.

Les propriétés viscoélastiques individuelles des trois fibres principales du cytosquelette ont été mesurées par Janmey et al. (1991) pour des concentrations différentes de polymères. Ils utilisent un appareil de torsion capable d'imposer des contraintes sur les spécimens et ils obtiennent les réponses contrainte-déformation et le module élastique G' .

La figure 1.15 montre les caractéristiques contrainte-déformation de l'actine, la vimentine, la tubuline et la fibrine (composante principale des caillots sanguins) à des concentrations fixes en protéines de 2 mg ml^{-1} . Les fibres de tubuline se rompent à partir d'une déformation de 60%, alors que la F-actine est capable de résister à des contraintes plus grandes mais sous faibles déformations par rapport aux fibres de vimentine et de fibrine. La F-actine se rompt à partir d'une déformation de 20%. La vimentine est la plus déformable de toutes et ces fibres gardent leur forme fibrillaire sans se rompre.

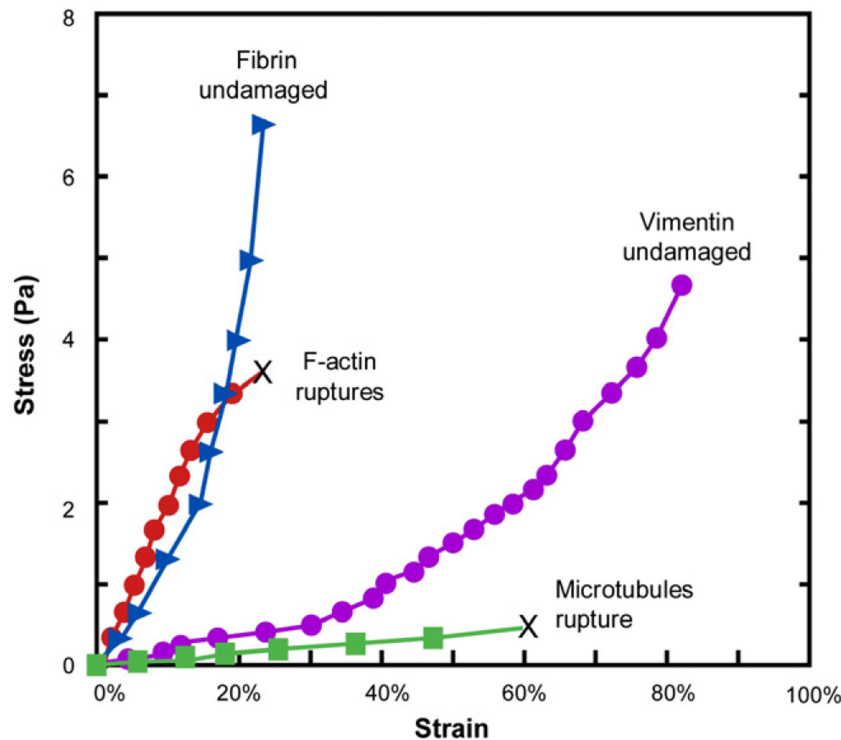


FIGURE 1.15 – Courbes contrainte-déformation de biopolymères : F-actine, vimentine, tubuline et fibrine (composante des caillots). Les données sont obtenues par la mesure de la déformation 30 s après application d'une contrainte. La concentration de chaque gel est de 2 mg/ml. La rupture des réseaux de F-actine et tubuline est indiquée par un "x". (Suresh, 2007)

La figure 1.16 montre la variation du module élastique G' de ces quatre biopolymères en fonction de la concentration. L'actine et la fibrine ont une pente de 2, le module élastique est donc proportionnel au carré de la concentration (Janmey et al., 1991).

Bien que la réponse *in vivo* de ces filaments de protéines dans le cytoplasme soit différente par rapport à celle observée dans les expériences de laboratoire, ces mesures fournissent des connaissances approfondies sur le rôle relatif des différents composants du cytosquelette. Parmi les différents filaments, la F-actine est la plus résistante aux contraintes jusqu'à une valeur critique de déformation. Ceci peut expliquer le fait que les réseaux d'actine corticale (sous la membrane) se réarrangent facilement sous de fortes contraintes pour faciliter la locomotion. Les filaments intermédiaires sont à la base de l'intégrité structurale de la cellule puisque ces fibres sont résistantes aux grandes déformations en gardant leur structure. Les filaments intermédiaires ont aussi un comportement non linéaire dans le sens où ils se rigidifient quand la contrainte augmente (Lin et al., 2010). Les microtubules se déforment très facilement et résistent peu aux contraintes. Ils fonctionnent en collaboration avec les autres fibres pour stabiliser le cytosquelette. Des études montrent que les réseaux de microtubules sont résistants à la compression (Brangwynne et al., 2006).

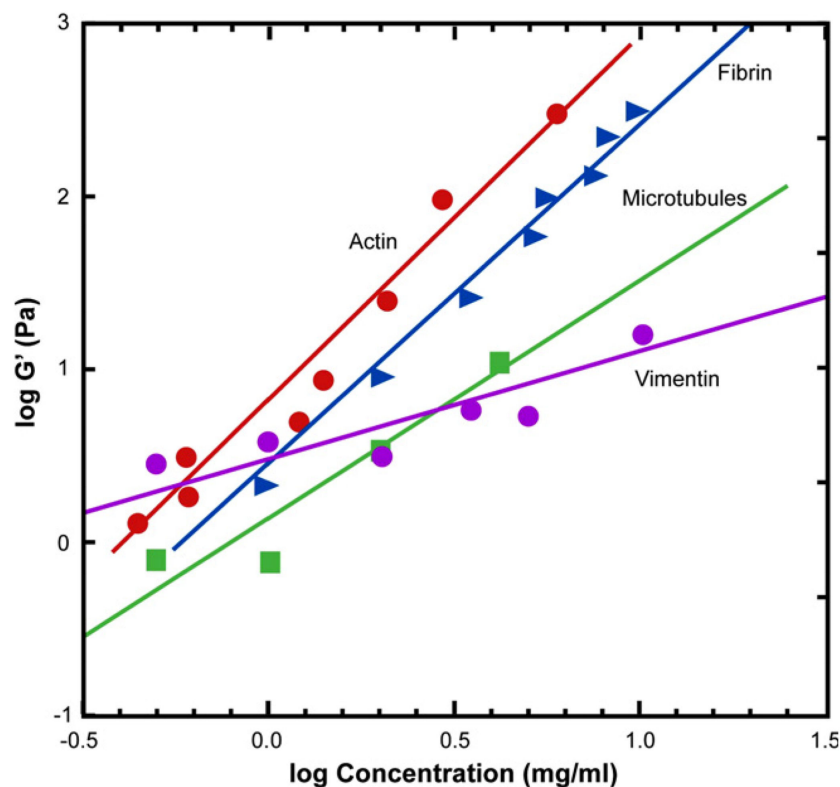


FIGURE 1.16 — Le module élastique des quatre biopolymères (actine, vimentine, tubuline et fibrine) en fonction de la concentration en protéines (Suresh, 2007)

Beaucoup de matériaux biologiques mous deviennent plus rigides quand ils sont déformés. Ce comportement non-linéaire est défini comme une augmentation du module d'Young avec la contrainte. Les modules G' et G'' sont déterminés dans

le domaine des petites déformations, ou le domaine linéaire, soit le domaine où ils restent constants en fonction de la déformation appliquée. L'amplitude des modules permet de déterminer quelles structures sont responsables de la rigidité. Par exemple, *in vivo*, la concentration en protéines du cytosquelette est de 10 mg/ml en G-actine, alors que les tubulines et protéines des filaments intermédiaires ont une concentration un peu plus faible. Des études *in vitro* montrent que les réseaux d'actine réticulés à cette concentration ont un module élastique de l'ordre de 10 à 5000 Pa, de même pour les filaments intermédiaires, mais seulement s'ils sont déformés sous fortes contraintes (Janmey et al., 1991; Wachsstock et al., 1993). Les microtubules peuvent aussi contribuer à la rigidité de la cellule s'ils sont liés aux autres deux réseaux de filaments, mais la plupart des études où les microtubules sont dépolymérisés, montre qu'il y a peu d'effet des microtubules directement sur l'élasticité de la cellule sauf si cette dépolymérisation induit des réarrangements et désassemblages des autres types de filaments (Takai et al., 2006; Trickey et al., 2004).

La valeur des modules élastiques cellulaires calculée par l'étude de la relation force-déformation est très difficile à interpréter même si les résultats des expériences sont reproductibles et bien contrôlés. Parmi les facteurs qui compliquent l'analyse existe le fait que la structure de la cellule n'est pas homogène. Les premières études sur la mécanique cellulaire montrent que les cellules en migration ont des couches hiérarchisées avec un contenu liquide, entouré par deux ou trois couches solides qui contiennent ou non les organelles et une très fine couche hautement élastique, la membrane (Mast, 1923). Les modules élastiques calculés à partir des déformations subcellulaires dépendent des modèles utilisés. La composition du cytosquelette, la densité de réticulants, et la présence d'autres composants cellulaires varient spatialement et temporellement.

Le matériel bioélastique est intrinsèquement non-linéaire, dans la mesure où sa résistance aux déformations dépend de l'étendue de la déformation, même sans remodelage actif de la structure. Cette réponse non-linéaire est une conséquence des propriétés physiques des polymères semi-flexibles et permet aux cellules de modifier leur rigidité en appliquant des déformations internes, appelés pré-contraintes, grâce à l'activation des moteurs. Une autre complication est que la résistance élastique des cellules n'est probablement pas due uniquement à la structure des réseaux mais que la dynamique joue un rôle majeur. Par exemple, quand les filaments d'actine ne sont pas fortement réticulés, l'activation des moteurs de myosine augmente la fluidité (Etienne et al., 2015) parce que les longs filaments couissent les uns par rapport aux autres plus facilement lorsqu'ils sont propulsés par l'actomyosine (Humphrey et al., 2002).

Au vu de toutes ces complexités, il est d'ailleurs surprenant que des variations bien significatives entre types cellulaires soient identifiées. Ceci suggère que les cellules maintiennent une rigidité contrôlée en conditions normales et donc la déviation de la normalité peut être considérée pour identifier les cellules anormales

([Guck et al., 2005](#)).

1.2.5 L'adhésion et les intégrines

In vivo, les cellules eucaryotiques existent en association avec la matrice extracellulaire (ECM). En fait, certaines cellules sont incapables de se diviser si elles ne sont pas adhérentes. La cellule forme des liens avec le substrat via des points focaux d'adhésion. Ces domaines adhésifs sont principalement formés de protéines transmembranaires qui appartiennent à la classe des intégrines qui peuvent former des connections mécaniques entre l'ECM (la fibronectine, collagène, etc) et les fibres d'actine. Les points focaux d'adhésion sont sensibles aux propriétés chimiques et mécaniques de la surface. En plus de participer à l'ancrage de la cellule et de son cytosquelette d'actine au substrat, les points focaux d'adhésion sont aussi au centre de la signalisation.

L'influence de l'environnement

Le cytosquelette des cellules est lié à l'environnement externe et sert de médiateur pour les changements à courte et grande échelle temporelle dans le comportement cellulaire. Que cela soit en contact direct avec les cellules voisines ou avec la matrice extracellulaire ECM, les cellules reçoivent un signal externe qui guide les comportements complexes comme la motilité, et dans certains cas la différenciation (par exemple la différenciation de cellules embryonnaires en cellules épithéliales, endothéliales, ostéoblastes, neuronales...). La contribution des signaux chimiques est déjà bien caractérisée, alors que les signaux physiques sont devenus récemment centres d'intérêt. Des études plus récentes montrent que la tension générée par le cytosquelette en contraction est utilisée pour sentir les propriétés mécaniques du substrat, ce qui induit une réorganisation du cytosquelette et du comportement cellulaire ([Discher et al., 2005](#)). Néanmoins, la question sur l'importance du signal de la rigidité ou de la force fait encore débat ([Chen, 2008](#)).

1.3 La mécanique du cancer

Le cancer est une maladie causée par le dysfonctionnement de la régulation des signaux cellulaires qui contrôlent toutes les fonctions de la cellule, dont la prolifération et l'apoptose. Ceci est généralement causé par des mutations de gènes qui expriment des protéines clés incluses dans ces fonctions cellulaires. En particulier, la progression du cancer vers un état métastatique est accompagnée par un changement des propriétés mécaniques cellulaires ainsi que de l'environnement extracellulaire (ECM). La Fig. 1.17 schématise la variation des propriétés mécaniques à travers les étapes du processus cancéreux. Dans ce modèle proposé par [Weder et al. \(2014\)](#), la transformation de cellules d'un mélanome non invasif en des cellules cancéreuses invasives est associée à une diminution de la rigidité des cellules pour

promouvoir la déformation cellulaire, l'invasion des tissus avoisinants et la transmigration (passage des cellules cancéreuses à travers la barrière endothéliale). La survie des cellules dans la circulation sanguine, l'adhésion à l'endothélium, ainsi que l'extravasation (passage des cellules des canaux sanguins/lymphatiques aux tissus avoisinants) nécessitent des modifications de l'architecture du cytosquelette et les propriétés mécaniques des cellules cancéreuses. Enfin la colonisation d'un nouveau tissu est encore caractérisée par de nouveaux changements des propriétés mécaniques en fonction de l'environnement.

Ce modèle est intéressant car il reflète les observations effectuées par les études sur les propriétés mécaniques de cellules normales et cancéreuses.

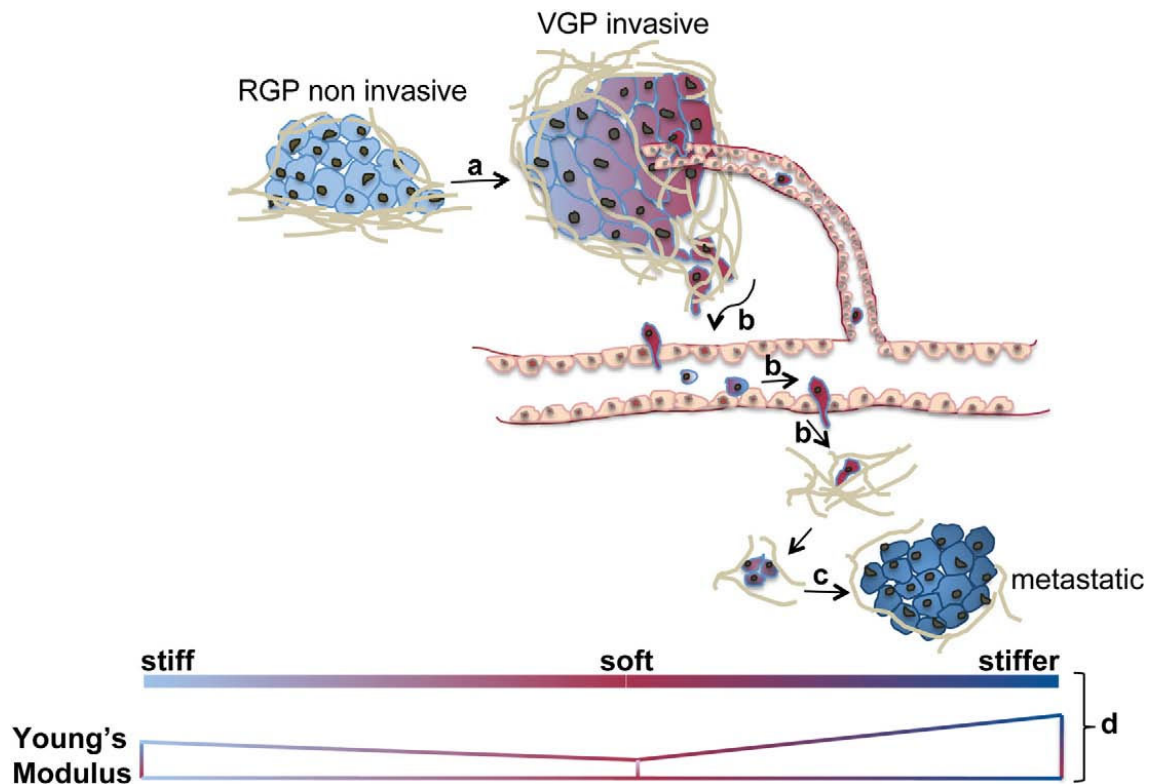


FIGURE 1.17 – Augmentation de la plasticité de cellules cancéreuses pendant les étapes de métastase. Dans le modèle proposé ici, le passage des cellules cancéreuses d'un état non invasif à un état invasif est associé à une diminution de la rigidité de la cellule qui promeut la déformation cellulaire, l'invasion dans les tissus avoisinants, et l'intravasation (a,b). La survie de la cellule dans la circulation, l'adhésion à l'endothélium, l'extravasation (b) et la colonisation de nouveaux sites (c) demandent des modifications supplémentaires de la cyto-architecture et la rigidité des cellules métastatiques (d) (Weder et al., 2014).

De récentes études montrent que le micro-environnement des tumeurs influence les processus majeurs du cancer dont l'angiogenèse⁵ (Nyberg et al., 2008; Watnick, 2012), la transition épithelio-mésenchymateuse⁶ (Talbot et al., 2012), le potentiel métastatique (Wirtz et al., 2011; Park et al., 2010; Robinson et al., 2009), l'agressiv-

5. processus pathologique de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins

6. Passage des cellules à une forme non différenciée

ité (Koontongkaew, 2013; Fraley et al., 2010) et la réponse des cellules cancéreuses aux agents anticancéreux (Straussman et al., 2012). La compréhension de l'influence de l'environnement mécanique et biochimique des cellules cancéreuses est donc essentielle pour le combat contre le cancer. Le micro-environnement de la tumeur est composé de cellules cancéreuses, d'une matrice extracellulaire ECM, de fibroblastes, cellules immunitaires et des cytokines (molécules impliquées dans la signalisation cellulaire) (Korkaya et al., 2011; Mbeunkui and Johann, 2009).

Lekka et al. (1999) ont fait des mesures de rigidité par microscopie à force atomique (AFM) de cellules normales et cancéreuses provenant de la vessie. Ils ont montré que les cellules cancéreuses sont moins rigides que les cellules normales du fait d'une réorganisation du cytosquelette. Guck et al. (2005) ont utilisé un système microfluidique couplé à des pinces optiques pour étirer des cellules du sein et mesurer leur déformabilité. Les cellules sont étirées individuellement avec des forces de l'ordre de 200–500 pN. Les cellules du cancer du sein se déforment plus que des cellules non cancéreuses. Cette diminution en rigidité élastique correspond à une réduction de 30% de la quantité en F-actine causée par l'augmentation du potentiel métastatique. Aux plus grandes déformations, une contribution dans la variation d'élasticité peut être due à la réorganisation des filaments intermédiaires de kératine qui sont une des composantes principales du cytosquelette des cellules épithéliales.

Rother et al. (2014) ont montré que les propriétés mécaniques des cellules cancéreuses dépendent du potentiel métastatique des cellules. Ils ont mesuré les modules G' et G'' de neuf lignées cellulaires (normales et cancéreuses) et ils observent que plus une cellule est maligne, plus le rapport G''/G' à une fréquence donnée augmente.

Les cellules dans les tissus sont reliées par la matrice extracellulaire (ECM). L'avancée dans la recherche sur le cancer montre des variations de rigidité des tissus quand les cellules deviennent malignes. C'est pourquoi les oncologues font le diagnostic du cancer en sentant l'élasticité du tissu par palpation (Huang and Ingber, 2005). Il est déjà connu que l'ECM joue un rôle sur la formation de tumeur : une ECM plus rigide résulte en une tumeur plus rigide (Ingber et al., 1995). Il existe aussi des connections claires entre les mécaniques de cellule unique, la mécanique de l'ECM, la mécanotransduction et la formation de tumeur. Les cellules saines s'attachent sur un substrat plus rigide pour s'étaler, s'étirer et proliférer (Folkman and Moscona, 1978), ce qui n'est pas le cas des cellules cancéreuses (Wittelsberger et al., 1981). Quand les cellules épithéliales sont cultivées sur un gel d'ECM, les intégrines sont activées pour moduler les récepteurs des facteurs de croissance épidermiques (EGFR)⁷ pour influencer la différenciation cellulaire et la transformation en cellules cancéreuses. Les EGFR transmembranaires affectent la mécanotransduction en transférant les forces entre les polymères du substrat et la cellule via des points focaux d'adhésion (Park et al., 2005; Paszek et al., 2005). Les récepteurs de l'ECM et les points focaux d'adhésion relient l'environnement aux intégrines et au

7. EGFR : Epithelial Growth Factor Receptor. La surexpression de ce récepteur a été reliée à différents types de cancer.

cytosquelette. Ceci permet la transduction des signaux de l'ECM vers la cellule et vice versa.

L'effet du substrat peut être particulièrement observé dans le cas où des cellules de souris normales et transformées sont cultivées sur des substrats flexibles de polyacrylamide de différentes rigidités (Wang et al., 2000). Les auteurs de cette étude montrent que la réponse à la rigidité du substrat joue un rôle majeur dans la croissance de cellules normales et transformées (cellules modifiées par des oncogènes). En effet les cellules normales sur les substrats mous présentent une diminution de croissance, étalement et des forces de traction, alors que les cellules transformées ne semblent pas être autant affectées. Ils suggèrent que les cellules normales peuvent sentir la rigidité du substrat et donc une régulation mécanique conduit à l'apoptose, à la diminution de la croissance et au changement de forme. La perte de cette régulation dans les cellules transformées peut expliquer leur croissance non contrôlée.

Les récepteurs ECM et les sites d'adhésion à l'extérieur de la cellule sentent les forces de traction développées par les microfilaments d'actine, ce qui induit une boucle de régulation entre le cytosquelette et l'ECM à travers les intégrines et les points d'adhésion. Les forces de traction sont modulées par la protéine G- Rho et sa cible Rho-kinase (ROCK). La protéine Rho appartient à la superfamille Ras des G-protéines qui sont nécessaires pour les signaux intracellulaires et la régulation des processus cellulaires.

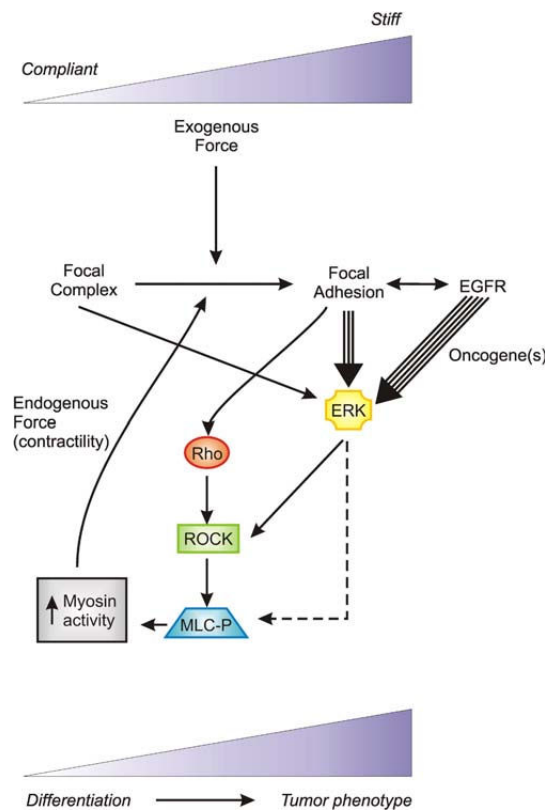


FIGURE 1.18 – Modèles de l'homéostasie de tension et la transformation en cellule maligne dépendante de la force (Paszek et al., 2005).

[Paszek et al. \(2005\)](#) montrent que lorsque la rigidité de l'ECM est modifiée, les intégrines activées par la variation de rigidité influencent la contractilité de la cellule en activant *Rho*. De plus elles modulent la signalisation cellulaire grâce à la kinase *Erk* (une enzyme qui enlève un phosphate à l'ATP), qui est responsable de la transmission de signaux de la surface de la cellule au noyau en activant les facteurs de transcription pour influencer la prolifération cellulaire. En retour, la signalisation liée à la contractilité et la prolifération va encore plus modifier la rigidité de l'ECM. Même une petite variation dans la rigidité de la matrice perturbe l'architecture du tissu et modifie la tension du cytosquelette pour promouvoir l'assemblage des points focaux d'adhésion et augmenter l'activation de *Erk*. Ces résultats mettent en valeur la présence d'un circuit mécanorégulateur qui intègre les signaux mécaniques de l'ECM (forces exogènes) en un ensemble de points focaux d'adhésion via la contractilité du cytosquelette pour réguler le phénotype de la cellule et du tissu (Fig. 1.18). Ainsi une homéostasie de tension est essentielle pour la croissance et une différenciation normale des tissus. Ceci conduit à une boucle fermée de signalisation mécanique qui s'organise de concert avec la signalisation des tumeurs pour promouvoir la transformation en cellule maligne ([Huang and Ingber, 2005](#)).

Ainsi les forces mécaniques externes ou internes peuvent affecter l'activité des facteurs de régulation de la dynamique et donc influencer l'organisation des filaments dans le réseau cellulaire.

1.4 Sonder la mécanique cellulaire : mesure et théorie

Un grand nombre de techniques expérimentales ont été développées pour mesurer et quantifier les propriétés mécaniques des cellules en appliquant une perturbation mécanique de la cellule sous la forme d'une déformation, d'une force ou de l'observation des réponses statiques et dynamiques des cellules. Des estimations de la rigidité des cellules grâce à différentes méthodes micro-rhéologiques couvrent une grande gamme en fonction de la méthode utilisée, le type et l'amplitude de déformation ([Janmey and McCulloch, 2007](#)).

En parallèle, une série de modèles a été introduite pour comprendre l'origine physique de la rigidité et de la viscoélasticité des cellules. Pour l'instant, il n'existe pas de théorie globale qui explique de façon satisfaisante tous les phénomènes de la biomécanique catalogués dans la littérature. En fonction de la méthode de mesure, la cellule peut être considérée comme un milieu continu ou une matrice composée de microstructures fines ; comme un fluide ou un solide ; comme une structure statique ou une structure dynamique.

Dans cette partie, je décris les approches expérimentales et théoriques pour faire des mesures locales et modéliser les cellules.

1.4.1 Techniques de mesure

Récemment, des études poussées ont été réalisées sur la caractérisation du lien entre les forces mécaniques générées par la cellule ou l'environnement et le maintien des fonctions biologiques. Pour ce faire, des méthodes de mesure sur cellule unique à des échelles spatiales et temporelles variées, ont été mises au point comme la microaspiration ([Oh et al., 2012](#); [Stark et al., 2011](#)), les pinces optiques ([Simmons et al., 1996](#); [Guck et al., 2001](#); [Neuman and Nagy, 2008](#); [Li et al., 2002](#)), la microscopie à force atomique AFM ([A-Hassan et al., 1998](#); [Mahaffy et al., 2000](#); [Fabry et al., 2001](#)), les micropilliers ([Legant et al., 2013](#); [Fu et al., 2010](#)), ainsi que des techniques passives utilisant le mouvement brownien de billes dans la cellule. Le tableau 1.4.2 et la Fig.1.19 résument les techniques disponibles pour sonder les propriétés mécaniques des cellules uniques. Les méthodes sont partagées entre des méthodes "actives" et "passives". Les méthodes actives consistent à appliquer une contrainte/déformation à la cellule et de mesurer directement le module élastique. Cependant, pour passer de cette mesure au calcul du module viscoélastique, il faut faire des hypothèses supplémentaires géométriques. Quand aux méthodes passives, elles consistent à détecter le mouvement aléatoire de particules traceurs en réponse aux sollicitations du milieu sans force appliquée.

Ces techniques contribuent à notre compréhension des propriétés mécaniques des cellules et cytosquelette. Toutes ces techniques sont complémentaires avec leurs propres avantages et désavantages. Cela est dû au fait que la cellule est un milieu complexe, où l'hétérogénéité, la plasticité, le remodelage actif et les mécanismes de signalisation sont tous dominants.

La mesure directe des propriétés mécaniques d'un matériau demande une application de force précise et bien définie ainsi qu'une mesure précise de la déformation résultante.

Les principaux outils de mesure de la mécanique cellulaire donnent des informations sur la structure et la dynamique du cytosquelette, la rigidité locale de la cellule, le stockage et la dissipation de l'énergie mécanique et la régulation de la tension interne.

1.4.1.1 Les pinces optiques et magnétiques

Pincés optiques

Les pinces optiques utilisent un gradient de force qui agit sur des particules au centre d'un rayon laser focalisé ([Ashkin, 1992](#)) (Fig.1.19a). En suivant le déplacement des vésicules ou billes par rapport au piège optique, il est possible de déduire la force appliquée et le déplacement des billes dans le référentiel des cellules, et donc d'avoir accès aux modules élastique et visqueux.

Un désavantage de cette méthode concerne les forces imposées par pince optique qui ne sont pas suffisamment importantes (< 200 pN) pour promouvoir des déformations significatives, nécessaires pour simuler des situations *in vivo* de cellules

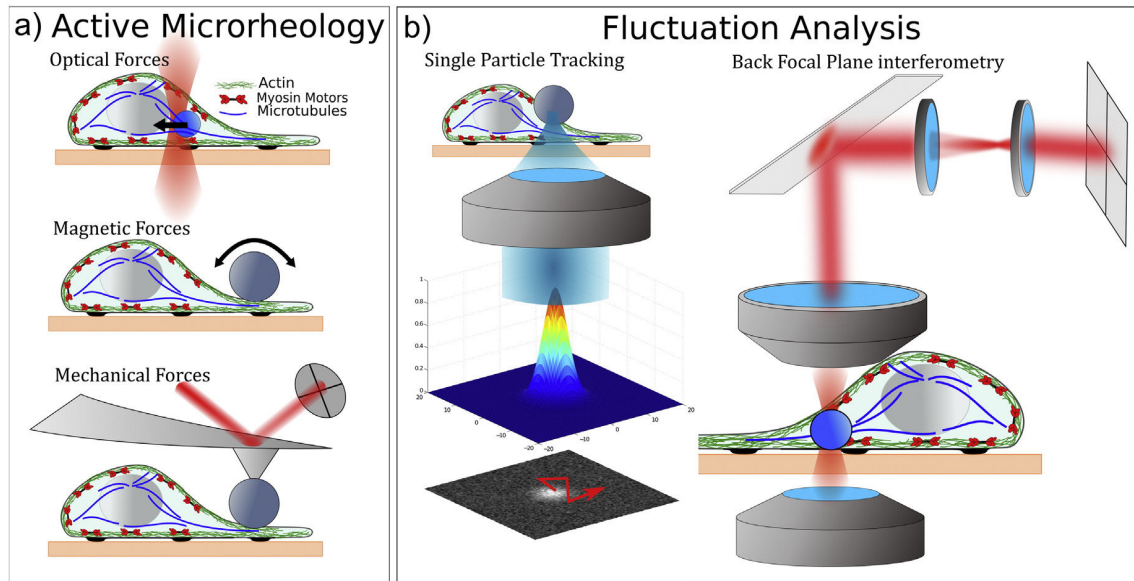


FIGURE 1.19 – Résumé des techniques expérimentales actives et passives les plus communes pour déterminer la mécanique cellulaire localement et la méthode passive. (a) Les méthodes microrhéologiques actives fournissent des propriétés locales du matériau. (b) Les méthodes passives permettent de mesurer la microrhéologie. (Ahmed et al., 2015)

cancéreuses. De plus, l'exposition directe du faisceau à la cellule pendant l'étirement est un autre désavantage car cela endommage la cellule.

Magnétocytométrie

Le principe des expériences de magnétocytométrie (MTC : Magnetic Twisting Cytometry) (Wang et al., 1993; Maksym et al., 2000; Fabry et al., 2001; Laurent et al., 2003) est basé sur le couple exercé par un champ sur un dipôle magnétique.

Cette technique génère des forces appliquées sur des billes ferromagnétiques avec un électroaimant pour mesurer la réponse mécanique des cellules. Les billes peuvent être attachées à la surface des cellules en utilisant des adhésions spécifiques. Le diamètre des billes est d'environ 5 μm . Un gradient de champ magnétique est imposé à la bille et le déplacement de cette dernière en réponse à la force appliquée peut être mesuré avec une résolution spatiale sub-nanométrique (en dessous de la limite de la résolution optique du microscope) (Fig. 1.19). Les mesures effectuées à l'aide de cette technique montrent que l'on reste dans un domaine de déformation linéaire pour la cellule à grandes contraintes (1 à 300 Pa) et grandes déformation (5 à 500 nm de déplacement de la bille (Fabry et al., 2001). Les perturbations sinusoïdales sont sur une gamme de fréquences de 10^{-2} à 10^3 Hz. Les avantages sont que la réponse de fluage à une force peut être mesurée sur une longue durée. Avec un champ homogène, il est possible de faire de bonnes moyennes en suivant simultanément plusieurs billes attachées aux cellules. Des billes sub-micrométriques peuvent être aussi internalisées et attachées directement au cytosquelette.

Le désavantage de cette technique est qu'elle est invasive. Une comparaison de

ces deux techniques a été effectuée (Laurent et al., 2002) avec des billes de même diamètres et les valeurs de E avec la MTC sont plus petites que celles obtenues avec des pinces optiques. Ceci reflète bien l'hétérogénéité des résultats en fonction de la méthode utilisée.

1.4.1.2 La microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique permet la mesure locale de propriétés mécaniques. Un levier flexible est utilisé pour indenter la cellule (Radmacher et al., 1993; Radmacher, 2007). La déflexion du levier est mesurée par un laser qui est réfléchi à la surface du levier et illumine les photodiodes comme décrit dans la Fig.1.19a. Pour mesurer les propriétés mécaniques de la cellule, la pointe peut être sphérique ou pyramidale, ce qui permet l'utilisation des modèles d'analyse de Hertz et Sneddon (Sneddon (1951)) qui décrivent la force comme fonction de l'indentation en prenant en considération les propriétés mécaniques du matériau. Ces modèles sont plus complexes que ceux avec des particules intracellulaires puisque l'aire d'interaction augmente quand l'indentation du levier augmente.

Mahaffy et al. (2000) ont proposé un protocole pour mesurer les propriétés viscoélastiques par AFM. La gamme de forces applicables par cette technique va de la dizaine de pN à quelques centaines de nN. Pour la mesure des propriétés viscoélastiques des cellules en régime sinusoïdal, les forces appliquées restent relativement faibles (typiquement de quelques centaines de pN à du nN). Des mesures des modules élastiques (G') et visqueux (G'') de cellules cancéreuses ont été effectuées avec cette méthode (Alcaraz et al., 2003), et un marqueur du potentiel métastatique a pu être déduit (Rother et al., 2014). La dominance de l'actine dans la détermination de la rigidité de la cellule est montrée dans une étude utilisant un microscope à force atomique (AFM) pour quantifier la rigidité avec des indentations inférieures à 200 nm de cellules endothéliales (Costa et al., 2006)

L'un des avantages de l'AFM est une grande gamme de forces accessibles, avec des microscopes commerciaux bien développés et une grande gamme de géométries de leviers. La difficulté de ces mesures réside dans la prise en compte de certaines corrections, comme la force de trainée ou la forme de la pointe (Rico et al., 2005)

Une description plus détaillée de cette méthode est faite dans le chapitre 2.

1.4.1.3 Méthodes passives

Des méthodes passives sont aussi capables d'extraire des propriétés viscoélastiques en suivant le mouvement Brownien des organelles ou des microparticules dans la cellule (Levine and Lubensky, 2000). La résolution est sub-nanométrique et d'environ la microseconde grâce au laser optoélectronique. La gamme de fréquences est environ de 0.1 à 30000 rad.s⁻¹. Les modules viscoélastiques de l'intérieur de la cellule peuvent être obtenus à partir du mouvement des particules. Le mouvement quadratique moyen des traceurs (Mean Squared Displacement MSD) est mesuré.

Une fonction de corrélation entre deux positions de particules contenues dans le milieu cellulaire permet de remonter au module viscoélastique (Lau et al., 2003).

Il est possible de remonter à la composante active d'un gel de polymère en combinant une méthode passive à la dynamique du cytosquelette (Mizuno et al., 2007). Cette méthode est non-invasive puisque les perturbations ne sont pas appliquées de l'extérieur. Un des désavantages majeurs de ces techniques est le caractère passif, et donc on ne peut pas appliquer de contraintes.

1.4.2 Autres méthodes

D'autres méthodes peuvent être utilisées pour caractériser la contractilité, comme la microscopie à force de traction. Cette technique passive a pour but de mesurer la force générée par les cellules en réponse aux perturbations mécaniques et chimiques et faire le mapping des forces de traction générées pendant la migration. C'est une approche avec le minimum de perturbations pour la cellule. Initialement, les substrats élastiques étaient utilisés pour étudier le champ de contraintes en regardant les rides à la surface des substrats causées par la contraction active des cellules (Harris et al., 1980). Une amélioration de la méthode par l'utilisation de substrats en silicone ou en polyacrylamide contenant des billes a permis la mesure du champ de déformation grâce au déplacement des billes insérées dans le substrat (Sheetz et al., 1998).

1.4.3 Modèles théoriques

Les expériences sur cellules ne sont pas suffisantes en soi pour fournir une interprétation claire des propriétés mécaniques de la cellule. Pour mieux comprendre l'activité dans la cellule, il est nécessaire de développer des modèles pour interpréter les mesures expérimentales. Il y a deux approches différentes pour modéliser le comportement mécanique de la cellule : les modèles basés sur la microstructure des cellules, dont la ténoségrité, et une approche basée sur le modèle des milieux continus. La première approche voit le cytosquelette comme la composante structurale majeure de la cellule (Stamenović and Ingber, 2002) alors que les modèles des milieux continus supposent que la cellule est constituée de couches homogènes avec des propriétés continues (Fabry et al., 2001). Les modèles des milieux continus sont généralement résolus grâce à la méthode des éléments finis (FEM). Récemment, la mécanique active de cellules et du cytosquelette est aussi modélisée. Ces modèles cherchent à comprendre ce qui se passe au niveau du cytosquelette et des moteurs moléculaires (Mizuno et al., 2007).

Dans cette partie, quatre modèles principaux sont présentés : les modèles continus élastiques ou viscoélastiques, le modèle SGR (Soft Glassy Rheology), la ténoségrité et le modèle des gels actifs. De nombreuses revues font des descriptions plus détaillées des modèles mécaniques de la cellule (Stamenović and Ingber, 2002; Lim et al., 2006).

Méthodes	Applications	Inconvénients	Références
Micropipette	Mesures de déformations non linéaire	la géométrie limite les mesures	Hochmuth (2000)
Rhéomètre	Une grande gamme de forces peut être mesurée (1nN à 1 microN)	Mesures sur cellules isolées impossibles	Fernández and Ott (2008)
Etirement optique (Optical stretching)	Sans contact et non-destructive.	Surchauffe de la cellule. Une modélisation très poussée est nécessaire pour avoir les profils de force.	Guck et al. (2001)
Magnéto-cytométrie	Une grande gamme de fréquences [0.01-1000Hz] Mesures en parallèle sur un grands nombre de cellules	Faible résolution spatiale. Besoin de fonctionnaliser les billes avec des protéines d'adhésion	Wang et al. (1993) ; Maksym et al. (2000) ; Fabry et al. (2001) ; Féréol et al. (2008)
Suivi de particules (Particle tracking)	Mesures quantitatives du module de cisaillement. Peut être utilisé dans les conditions physiologiques.	Ne peut être utilisé que pour les cellules	Wirtz (2009) Crocker et al. (2000)
Pincettes optiques	Haute résolution. Les forces et les positions sont bien contrôlées	Surchauffe locale. Ne peut être utilisé qu'en régime linéaire (petites forces)	Ashkin (1992) Hénon et al. (1999) Guet et al. (2014)
Microscopie à force atomique (AFM)	Haute résolution spatiale Mesures sur de grandes gammes de fréquences et de forces	Ne peut mesurer qu'une cellule à la fois.	Rotsch et al. (1997) ; Mahaffy et al. (2004) ; Alcaraz et al. (2003) ; Rosenbluth et al. (2006) ; Rother et al. (2014)

TABLE 1.2 – Différentes méthodes pour mesurer la microrhéologie de cellules.

1.4.3.1 Modèles viscoélastiques

Les cellules peuvent être modélisées comme un milieu continu, composé d'une ou plusieurs couches homogènes, si la taille de la zone d'intérêt est très grande par rapport aux dimensions de la microstructure (comme par exemple, dans le cas des études des déformations globales de la cellule). Ces modèles sont, par exemple, utilisés pour les expériences où un équilibre est atteint lorsqu'une charge donnée est appliquée. Dans le cas où des cellules endothéliales ne peuvent plus couler dans des micropipettes à partir d'une certaine pression de succion, la cellule peut être modélisée par les modèles solides élastiques ([Jones et al., 1999](#)).

En général il y a deux types de modèles des milieux continus appliqués aux cellules : une description élastique linéaire et une description viscoélastique linéaire. Dans le premier cas, la cellule est vue comme un solide, avec des propriétés élastiques homogènes, gouverné par la loi de Hooke. Cependant ce modèle ne prend pas en compte le comportement liquide des cellules, d'où le développement des modèles

viscoélastiques linéaires. Dans ce modèle, la contrainte appliquée à la cellule est reliée linéairement au taux de déformation.

La majorité des études utilise une description viscoélastique des cellules. Ceci permet de caractériser les réponses mécaniques dépendantes du temps des cellules en introduisant un nombre fini d'éléments élastiques et visqueux (ressort et amortisseurs) couplés en série ou en parallèle.

Cette approche est utilisée pour modéliser les propriétés viscoélastiques des cellules sanguines (leucocytes et érythrocytes) mesurées par micropipette (Dong et al., 1988). Ce modèle est aussi utilisé dans le cas d'expériences de magnétocytométrie (Mijailovich et al., 2002) pour quantifier l'influence de la contrainte sur les propriétés mécaniques.

Bien que ces modèles basés sur la mécanique des milieux continus donnent des résultats acceptables en terme de propriétés mécaniques globales, ils présentent un certain nombre de limitations. L'inconvénient principal est que la microstructure du cytosquelette est ignorée et la contribution discrète des fibres de stress aux courbes de force-déformation est moyennée et est incluse dans une description globale de la cellule. De plus, ces modèles ne peuvent pas décrire le comportement en loi de puissance que les cellules exhibent lorsqu'elles sont soumises à des sollicitations variant dans le temps.

1.4.3.2 Modèle SGR (Soft Glassy Rheology)

Ce modèle a été utilisé en biomécanique pour prendre en compte la réponse de cellules adhérentes soumises à des forces variant dans le temps. Il est basé sur les observations empiriques qu'un grand nombre de cellules montrent des propriétés rhéologiques similaires aux émulsions et mousses. Un des points communs principaux de ces matériaux, nommés matériaux "soft glassy" (vitreux mous), est que leurs constituants microscopiques sont toujours hors équilibre thermodynamique. Ainsi dans cette approche, les cellules sont considérées comme des matériaux "soft glassy".

Le modèle SGR a été développé par Sollich (1998) pour décrire les mousses et les émulsions. Le principe de ce modèle consiste à dire que les contraintes appliquées sur le milieu sont relaxées par des fluctuations non-thermiques, décrites par une température effective reliée à l'exposant de la loi de puissance en fonction de la fréquence. Les réponses rhéologiques macroscopiques sont liées aux réarrangements structuraux qui proviennent de la métastabilité des structures. Le modèle SGR décrit des particules piégées dans des puits d'énergie provenant des interactions avec les particules voisines. Ainsi, un remodelage de la structure microscopique se produit quand les particules s'échappent des barrières d'énergie pour atteindre un état plus stable.

En 2001, Fabry et al. (2001) utilisent le modèle SGR pour décrire la rhéologie des cellules mesurées par MTC. Les cellules sondées avec des mesures oscillatoires sur une grande gamme de fréquences (par magnétocytométrie (Maksym et al., 2000; Féréol et al., 2008) ou par AFM (Mahaffy et al., 2000; Alcaraz et al., 2003)) révèlent des

modules élastiques et visqueux qui augmentent avec la fréquence en loi de puissance faible. Ce comportement implique un spectre continu de temps de relaxation, ce qui veut dire qu'il n'y a pas un temps caractéristique donné pour les cellules.

Malgré sa capacité à décrire la rhéologie de la cellule sur une grande gamme de fréquences, le modèle SGR semi-empirique n'explique pas les propriétés mécaniques de la cellule aux très hautes fréquences.

1.4.3.3 Modèle de tenségrité

Un autre modèle théorique plus complexe basé sur l'organisation structurale et la composition des cellules est le modèle de tenségrité. Il prend son nom des principes architecturaux (génie civil) et stipule que les cellules sont des structures dont la stabilité est maintenue par des éléments sous tension (câbles) qui ne supportent pas la compression et par des éléments compressibles (support) qui équilibrent la tension dans les câbles. Cette tension est équilibrée par des éléments qui compriment et supportent et/ou par des attaches externes. Dans les cellules vivantes, les filaments d'actine et les filaments intermédiaires peuvent être vus comme des éléments sous tension et les microtubules, les fibres de stress et les attaches cellule-cellule et cellule-ECM comme des éléments qui équilibrent le système. Ainsi, les cellules et l'ECM travaillent ensemble pour équilibrer le système. Plusieurs études ont appliqué ce modèle de tenségrité aux cellules pour décrire un nombre de propriétés cellulaires, comme la rigidification causée par la pré-contrainte ([Stamenovic, 2005](#); [Laurent et al., 2003](#)). L'une des limites de l'hypothèse de tenségrité est le fait que la tenségrité est un modèle statique et ne peut pas expliquer les processus actifs de la cellule comme la polymérisation de l'actine ou la contractilité acto-myosine. Cependant, il apporte une idée réaliste de la structure, fonction de chaque élément du cytosquelette et parvient à prédire quelques comportements observés.

1.4.3.4 Les gels actifs

La mécanique active est un terme qui intègre les composants actifs d'un matériau dans sa description mécanique. Plus récemment, des gels du cytosquelette constitué d'actine/filamine soumis à des forces externes ont un comportement mécaniques proches de celui des cellules ([Galbraith et al., 2007](#)). Les cellules sont des machines complexes qui consomment constamment de l'énergie pour maintenir leur organisation spatiale et temporelle ([Mikhailov and Hess, 2002](#); [Mackintosh and Schmidt, 2010](#)). Pour avoir accès à la contribution active du mouvement intra cellulaire, des connaissances profondes des propriétés mécaniques locales sont nécessaires. En principe, les mesures mécaniques peuvent changer les propriétés de la cellule puisqu'elles enclenchent des signalisations qui résultent en une restructuration du cytosquelette ou l'activation des protéines moteurs ([Hoffman and Crocker, 2009](#); [Etienne et al., 2015](#)). L'effet des forces actives mécaniques sur l'auto-organisation et les propriétés des matériaux est un domaine de recherche de plus en plus important ([Wang and Wolynes, 2012](#); [Levayer and Lecuit, 2012](#); [Guo et al., 2014](#)). Les

expériences typiques combinent des mesures mécaniques actives avec des analyses détaillées du mouvement intracellulaire (Mizuno et al., 2007). Dans les années récentes, des théories de gel actif ont été proposées pour décrire et quantifier les flux et déformations dans la cellule (Joanny and Prost, 2009; Prost et al., 2015).

1.5 Les objectifs de cette thèse

Comprendre l'influence de l'environnement sur les propriétés mécaniques de cellules cancéreuses du carcinome de la vessie est l'objectif principal de cette thèse. Pour ce, il a fallu d'abord développer un protocole solide et robuste pour mesurer les propriétés mécaniques G' et G'' de cellules cancéreuses et le valider à l'aide de gels de polyacrylamide. Une fois le protocole validé, nous avons mis en évidence le lien entre la structure du cytosquelette et les propriétés mécaniques d'une lignée cancéreuse particulièrement invasive à l'aide de drogues. Un modèle a été mis au point pour décrire le comportement viscoélastique et en déduire des paramètres pertinents. La dernière étape a été d'effectuer une comparaison entre les différentes lignées de cellules cancéreuses. Pour finir, nous avons étudié l'influence de l'environnement sur le comportement viscoélastique de cellules cancéreuses.

Chapitre 2

La microscopie à force atomique

Le domaine de la mécanique cellulaire s’est agrandi ces dernières décennies grâce au développement de nouvelles techniques de micro et nanomanipulation. Une diversité d’instruments est utilisée pour mesurer les propriétés viscoélastiques des cellules vivantes ainsi que les interactions avec leur microenvironnement (adhésion et friction), dont les microplaques ([Thoumine and Ott, 1996](#)), les pinces optiques ([Hénon et al., 1999](#)), la magnétocytométrie ([Fabry et al., 2001](#)), etc. Parmi ces techniques, la microscopie à force atomique (AFM) a connu une expansion importante. Cet instrument permet d’obtenir des informations sur la morphologie, la topographie, la microrhéologie ainsi que les interactions de cellules vivantes sous conditions physiologiques ([Rotsch and Radmacher, 2000](#)).

La microscopie à force atomique (AFM) est un outil novateur qui appartient à une série de microscopies à sonde locale (SPM pour scanning probe microscopy), et qui est une des techniques responsables de l’émergence de la nanotechnologie moderne. L’AFM a un grand potentiel pour l’étude des cellules vivantes ([Kuznetsova et al., 2007](#)).

Ce chapitre passe en revue les principes de la microscopie à force atomique utilisés pour l’étude de la mécanique de cellules vivantes. Le protocole utilisé dans notre étude pour sonder les propriétés viscoélastiques de cellules cancéreuses de la vessie est présenté ainsi que la validation de ce protocole sur des gels de polyacrylamide de concentrations différentes et de rhéologie connue ([Abidine et al., 2015a](#)).

2.1 Introduction à la microscopie à force atomique

2.1.1 Principe de l’AFM

L’AFM est une méthode relativement neuve développée comme une première extension de la microscopie à sonde locale (SPM) dans les années 1980 ([Binnig et al., 1986](#)). L’AFM utilise des leviers flexibles, assimilés à des ressorts, pour mesurer des forces entre une sonde (la pointe AFM) fixée à l’extrémité d’un levier, et la surface de

l'échantillon (Fig. 2.1). Le principe repose sur le fait que la force locale (attractive ou répulsive) entre la surface et la pointe est déduite par la flexion du levier, nommée "déflexion". Dans notre cas, le levier est attaché à une structure rigide en verre ("glassblock"), et tout déplacement de la pointe est détecté par des photodiodes grâce au laser réfléchi sur le dos du levier. Le système de détection est très sensible et peut être visualisé en temps réel. Une petite variation de l'angle du levier est convertie en une déflexion mesurable sur les photodiodes.

En général, la photodiode est constituée de quatre quadrants afin que la position du laser puisse être calculée dans deux directions. La déflexion verticale du levier, qui représente la force d'interaction entre la pointe et le substrat, est mesurée par le déplacement vertical du spot laser sur les photodiodes.

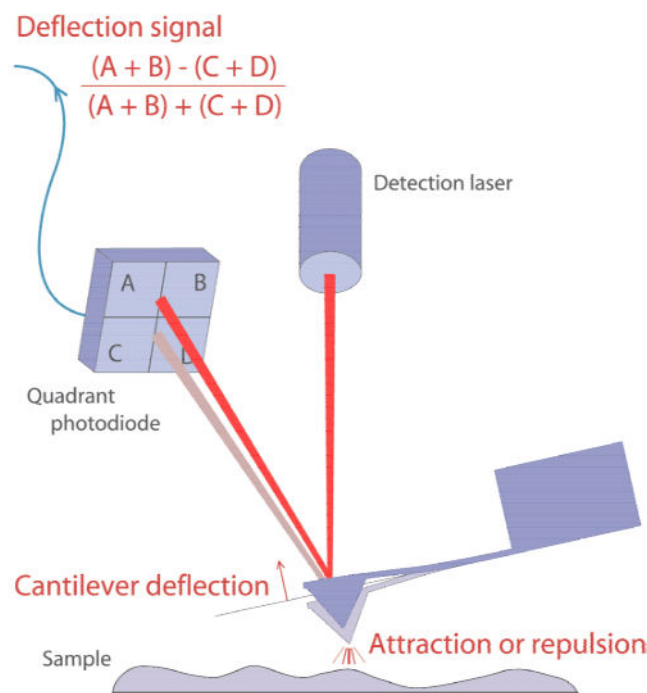


FIGURE 2.1 — Représentation du principe de mesure de l'AFM. Un laser est réfléchi sur le dos de la pointe et est détecté sur une photodiode à quatre quadrants. Un feedback est effectué par le logiciel pour ajuster la hauteur de la pointe. D'après *The NanoWizard AFM Handbook*.

2.1.2 Modes d'opération de l'AFM

En général l'AFM est utilisé pour imager des surfaces (topographie) et mesurer des propriétés mécaniques de ces surfaces. L'AFM peut être utilisé dans différents modes selon la manipulation désirée : mode contact et mode dynamique (non contact, contact intermittent ou modulation de force...).

En mode contact, la pointe est au contact de la surface et une force constante est appliquée. En mode dynamique, le levier vibre et c'est l'oscillation du levier qui est mesurée au lieu de la déflexion statique du levier.

Quand deux objets sont proches, les forces à longue distance sont attractives (forces capillaires et force de Van der Waals) et elles deviennent répulsives quand les objets se rapprochent l'un de l'autre (Fig.2.2). La situation est encore plus complexe quand les forces électrostatiques et autres interactions entre échantillons dans un liquide sont prises en compte.

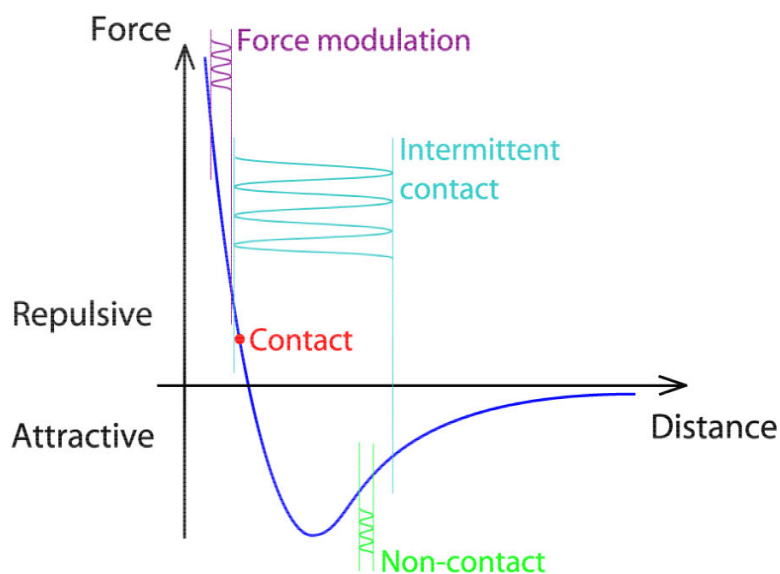


FIGURE 2.2 – Les différents modes de l'AFM. D'après *The NanoWizard AFM Handbook*.

2.1.2.1 Mode statique de contact

En mode contact, la pointe de l'AFM est en contact direct avec la surface de l'échantillon, et les forces entre la pointe de l'AFM et la surface sont mesurées. Le laser réfléchi sur la pointe AFM en contact est détecté sur un quadrant de la photodiode et ainsi chaque déflexion est quantifiée. La force verticale est contrôlée et la compression de l'échantillon est limitée ; ainsi il est possible de mesurer la force en fonction de la distance entre la pointe et l'échantillon (Fig. 2.3).

Ce mode peut être utilisé pour plusieurs types de manipulations, dont la topographie des surfaces grâce à sa haute résolution et la mesure de propriétés mécaniques grâce à l'accès aux forces exercées par l'échantillon sur la pointe.

Dans ce mode, il faut que le levier ne soit pas très rigide ni trop mou. En général la constante de raideur du levier est dans la gamme $0.01-1 \text{ Nm}^{-1}$ pour des échantillons mous.

2.1.2.2 Mode dynamique

Le levier vibre au dessus ou au contact de la surface et l'oscillation du levier est mesurée. La phase entre l'oscillation imposée et le déplacement du levier peut être quantifiée.

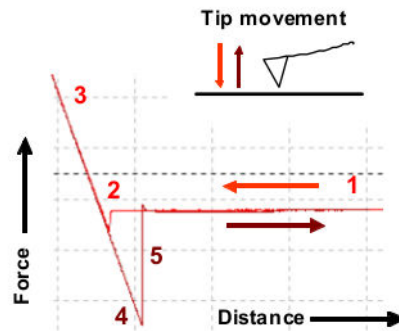


FIGURE 2.3 – Courbe de force-déplacement typique. La pointe se rapproche de la surface (1) et quand elle rentre en contact (2), la force appliquée sur le levier augmente. Une fois que le levier atteint une force prédéfinie (3), la pointe se rétracte. C’est à partir de cette courbe qu’il est possible de déduire le module d’Young en utilisant le modèle de Hertz. D’après *The NanoWizard AFM Handbook*.

Il y a différents modes dynamiques en fonction du contact entre la pointe et la surface.

Le mode contact intermittent dit ”tapping”, est souvent utilisé pour faire la topographie de surfaces molles. Dans ce mode, le levier qui se déplace en z oscille au dessus de la surface en même temps qu’il la sonde en xy , de façon à ce que le levier ne touche le substrat que très brièvement. Les leviers utilisés pour ce mode doivent être rigides (raideur de constante de l’ordre de 1 à 40 Nm^{-1}).

En mode non-contact, le levier oscille au voisinage de la surface mais sans rentrer en contact avec celle-ci. Ce mode n’est pas beaucoup utilisé puisque des forces attractives peuvent attirer la pointe à la surface et les forces capillaires rendent les mesures très complexes.

Le mode modulation de force est particulièrement adapté pour effectuer des mesures viscoélastiques¹. La pointe indente le matériau d’étude d’une hauteur contrôlée et une oscillation sinusoïdale de faible amplitude est effectuée autour de cette position initiale. La réponse de la cellule est mesurée et il est possible d’en extraire un module de cisaillement complexe. Ce mode est décrit en détail dans la section 2.2.4.

2.2 Mesurer les propriétés mécaniques de cellules vivantes avec un AFM

L’AFM utilise un levier flexible avec une pointe à son extrémité pour indenter, tirer ou scanner les échantillons. Les forces appliquées sur les échantillons sont déterminées en mesurant la déflexion du levier dont la constante de raideur (k en N/m) est connue. Bien que l’AFM soit utilisé pour mesurer les propriétés mécaniques

1. D’après The NanoWizard AFM Handbook

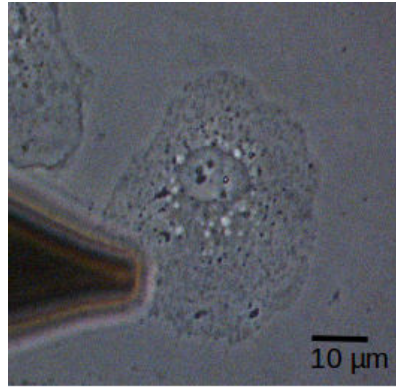


FIGURE 2.4 – Image d’une cellule T24 et de la pointe AFM dans notre setup.

d’échantillons, les systèmes AFM commerciaux sont essentiellement utilisés pour obtenir des images topographiques. Des capteurs de position sont incorporés dans les systèmes ce qui permet un contrôle du déplacement de la pointe (ou de l’échantillon), l’application d’oscillations précises et la mesure directe du déplacement. Pour pouvoir faire des mesures dynamiques, la résolution verticale doit être très importante. Pour faire des mesures sur des systèmes biologiques vivants, un contrôle de la température est nécessaire. Enfin, la constante de raideur du levier est calibrée de façon minutieuse grâce aux fluctuations thermiques ([Hutter and Bechhoefer, 1993](#)).

Dans notre étude nous utilisons un AFM JPK Nanowizard 2 (Fig. 2.5) qui inclut toutes ces fonctionnalités. Les mesures sont ainsi reproductibles et d’une résolution de l’ordre du pN et du nm pour les forces et la distance.

Cet instrument de pointe comprend une tête (Fig. 2.6) posée sur une platine et qui est équipée de systèmes piézoélectriques de translation en x, y et z. La tête contient un laser qui pénètre du côté poli du bloc de verre et est réfléchi sur le levier pour revenir vers la photodiode à quatre quadrants. Il est possible ainsi de mesurer la déflexion du levier. Les mouvements de la pointe se font grâce aux ensembles piézoélectriques x, y et z. Le déplacement en z du levier est effectué grâce un circuit de rétro-contrôle. Il existe aussi un autre système piézoélectrique en ”CellHesion” qui permet des déplacements en z sur une distance de 100 μm et qui se trouve dans la platine.

Enfin le système repose sur un microscope optique inversé (Zeiss) pour imager les cellules (Fig. 2.4). Le déplacement en xy de l’échantillon est effectué manuellement sur une zone de travail d’environ $100 \times 100 \mu\text{m}^2$.

Dans notre configuration, la pointe, le signal laser et la photodiode sont synchronisés ce qui évite les problèmes de mise au point et de réalignement du spot laser et du signal réfléchi.

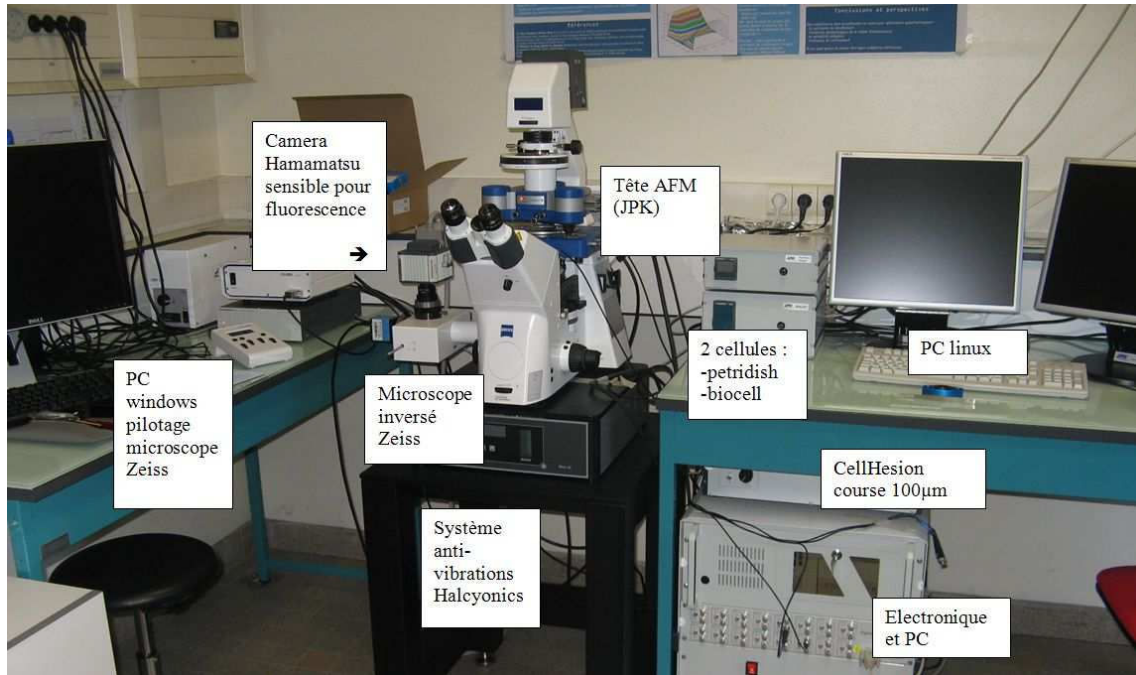


FIGURE 2.5 – AFM JPK Nanowizard 2 du LIPhy

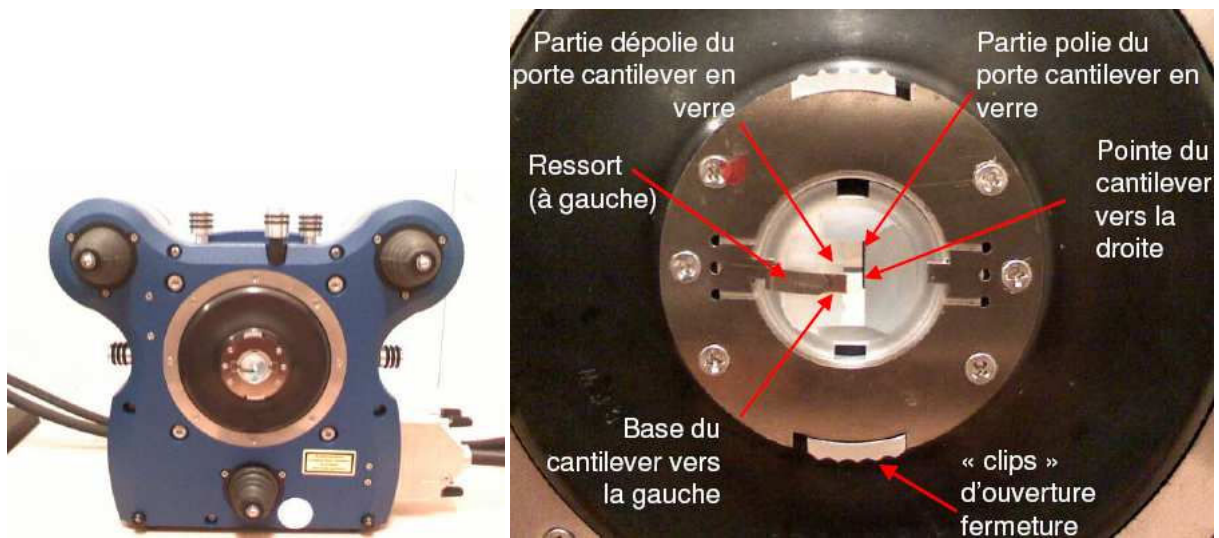


FIGURE 2.6 – La tête AFM (gauche) et la bloc de verre (droite). Source : Nanowizard handbook

2.2.1 Les leviers

Le levier est au cœur de l'AFM. Il est disposé sur une puce (Fig.2.7) qui est fixée sur le bloc de verre par un ressort (Fig.2.6 droite) et l'autre extrémité est dotée d'une pointe qui peut interagir avec la cellule.

Le levier se comporte comme un ressort de Hooke de rigidité k (N/m) pour les petites déflexions d (m), et grâce à la photodiode, il est possible de mesurer les variations de déflexion du laser réfléchi sur le levier. Ainsi la force appliquée sur le levier s'exprime par la relation linéaire $F = k \times d$ (Fig. 2.8).

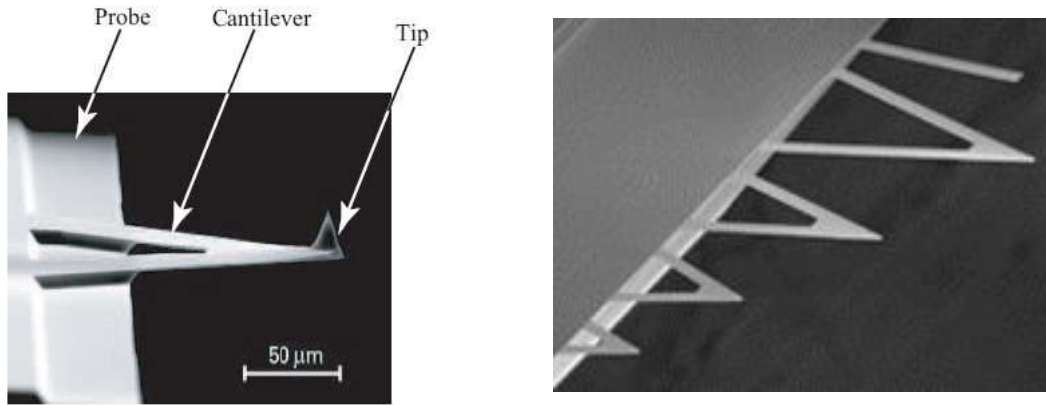


FIGURE 2.7 – Gauche : Levier triangulaire avec une pointe pyramidale. Droite : Image des différents types de levier MLCT sur une puce. De haut en bas : levier B rectangulaire, leviers triangulaires C - D - E - F. Le levier C, que nous utilisons couramment, a une fréquence de résonance moyenne de 7 kHz, une constante de raideur autour de 0.01 N/m, une longueur de 310 µm et une épaisseur de 20 µm. Le dos des leviers est recouvert d'une couche d'or. Source : burkerafmprobes.com

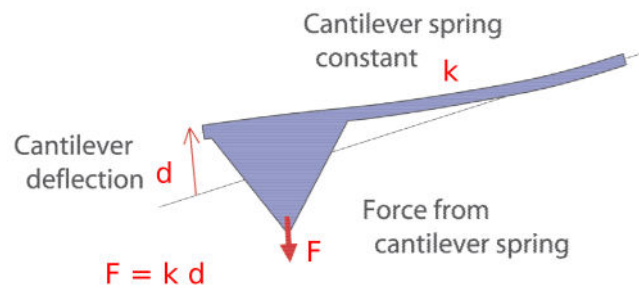


FIGURE 2.8 – La relation entre la déflexion d du levier de constante de rigidité k connue et la mesure de force F est décrite par une simple loi de Hooke. D'après *The NanoWizard AFM Handbook*.

Les constantes de raideur des leviers varient de 0.005 N/m à 40 N/m. La masse et la taille du levier influencent la fréquence de résonance (et la constante de raideur) donnée par : $f_0 = \sqrt{\frac{k}{4\pi^2 m_{eff}}}$ où f_0 est la fréquence de résonance, k la constante de raideur et m_{eff} la masse effective.

La plupart des leviers sont microfabriqués à partir de silicium ou nitrure de silicium, avec une couche d'aluminium ou d'or sur le dessus pour augmenter la réflectivité. L'or est utilisé le plus souvent dans les liquides car c'est un matériau inerte chimiquement. Le levier a une longueur comprise entre 85 et 310 µm et a généralement une forme rectangulaire ou triangulaire (Fig. 2.7).

Généralement, la surface des cellules est sondée avec des leviers flexibles de petit angle. Plus la sonde est pointue, plus la résolution de l'image est importante (Heuberger et al., 1996). En particulier, les pointes molles en nitrure de silicium de forme pyramidale sont très souvent utilisées pour obtenir des images de haute résolu-

tion de cellules vivantes (You and Yu, 1999). Les pointes pyramidales sont arrondies à leur extrémité avec un très faible rayon de courbure (~ 20 nm), ce qui permet une résolution des structures sub-cellulaires de cellules vivantes, comme le cytosquelette, qui joue un rôle essentiel dans la mécanique de la cellule. Les demi-angles θ des pointes pyramidales varient entre 15° et 80° .

En mode statique, la cellule est sondée par indentation de la surface de la cellule avec la pointe et en mesurant la relation force-indentation ($F - \delta$) où l'indentation est mesurée par $\delta = Z - d$, Z étant la hauteur du bloc de verre et d la déflexion. Les paramètres mécaniques de l'échantillon peuvent être déduits en effectuant un ajustement des données $F - \delta$ avec un modèle de contact approprié qui prend en compte la géométrie de la pointe. La forme et la géométrie des leviers influencent les propriétés de contact.

Le choix du levier et de la géométrie des pointes dépend des mesures que l'on souhaite effectuer. Une comparaison de différentes pointes a été effectuée sur un gel de polyacrylamide (voir la section 2.3.2). En mode contact, il est nécessaire d'utiliser des leviers de faible constante de rigidité (typiquement 0.01 N/m). Utiliser des pointes trop rigides (comme celles utilisées pour le mode contact intermittent) peut conduire à l'endommagement des cellules.

La pointe que nous utilisons est une pointe pyramidale à quatre côtés (MLCT, Bruker) de demi angle moyen petit de 18.75° (Fig. 2.9).

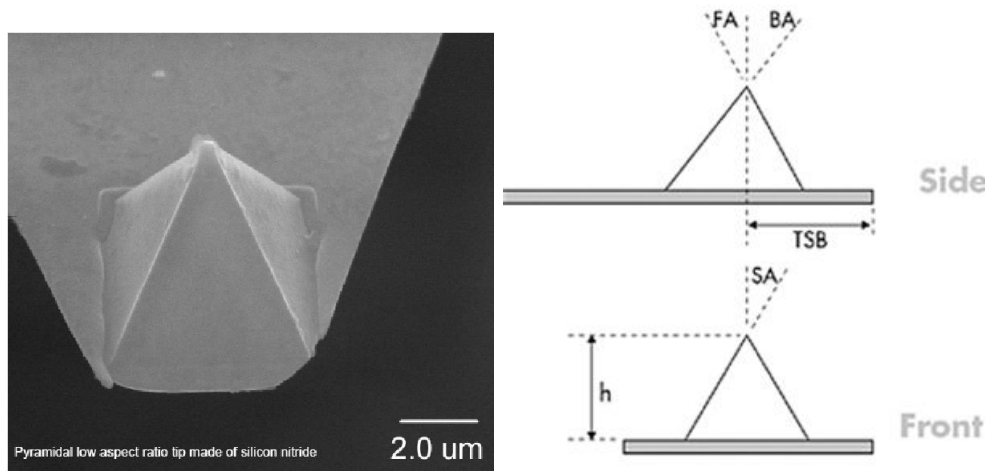


FIGURE 2.9 – Gauche : Image de la pointe pyramidale utilisée dans nos expériences. Droite : Schéma de la pointe ; $h = 2.5 - 8 \mu\text{m}$ est la hauteur de la pointe ; FA (Front Angle) = $15 \pm 2.5^\circ$; BA (Back angle) = $25 \pm 2.5^\circ$; SA (side angle) = $17.5 \pm 2.5^\circ$; Le demi-angle moyen est donc de $\theta = 18.75^\circ$. le rayon de courbure au bout est 20 nm ; TSB (Tip SetBack) = $4 \mu\text{m}$ est la longueur entre le centre de la pointe et l'extrémité du levier. Source : burkerafmprobes.com

2.2.2 Calibration de la constante de raideur

La constante de raideur des leviers est déterminée par la méthode du bruit thermique (Hutter and Bechhoefer, 1993). Dans le régime des petites déflexions, le levier

AFM est modélisé comme un oscillateur harmonique simple. D'après le théorème d'équipartition, chaque terme quadratique du hamiltonien du système est donné par $k_B T/2$:

$$\frac{1}{2}k_B T = \frac{1}{2}k \langle q^2 \rangle \quad (2.1)$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T la température absolue, k la constante de raideur du levier et $\langle q^2 \rangle$ le déplacement moyen carré de chaque mode d'oscillation du levier.

L'analyse du bruit thermique est maintenant une étape systématique des expériences AFM et cette calibration est effectuée en direct avant l'expérience grâce au logiciel automatisé et rapide (JPKdata). La position de l'extrémité du levier est en fluctuation constante à cause des vibrations thermiques de l'environnement. En connaissant la température de l'environnement et en ayant accès à une mesure précise de la déflexion du levier, il est possible d'avoir une mesure précise des déplacements et donc de la constante de raideur.

Les fluctuations libres du levier dans le liquide sont mesurées en fonction de la fréquence et ces données au pic de résonance sont ajustées par le modèle de l'oscillateur harmonique simple $H = p^2/2m + m\omega_0^2 q^2/2$ avec p la vitesse et q le déplacement.

L'énergie mesurée dans le système est donnée par la constante de raideur k et la moyenne des valeurs de la déflexion verticale du levier $\langle q \rangle$ (Eq. 2.2) :

$$\langle \frac{1}{2} m \omega_0^2 q^2 \rangle = \langle \frac{1}{2} k_B T \rangle = \frac{1}{2} k \langle q^2 \rangle \quad (2.2)$$

La constante de raideur s'écrit donc $k = k_B T / \langle q^2 \rangle$, avec $\langle q^2 \rangle$ l'aire sous la courbe.

La courbe de résonance du levier peut être modélisée par un oscillateur harmonique :

$$q(f) = A \frac{f_0^2}{(f^2 - f_0^2) + (\frac{f_0 f}{Q})^2} \quad (2.3)$$

où A est l'amplitude, f_0 la fréquence de résonance et Q le facteur de qualité.

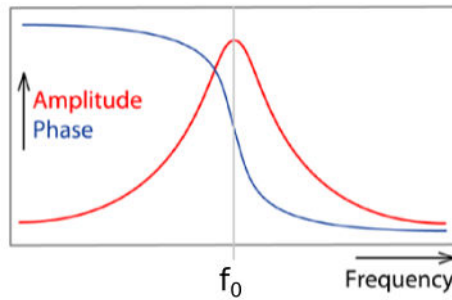


FIGURE 2.10 – Schéma de la courbe de résonance du levier en fonction de la fréquence f_0

Cependant, le levier n'est pas un oscillateur parfait, des facteurs de correction sont donc nécessaires à cause des erreurs systématiques de mesure. Des facteurs de correction ont été calculés par [Butt and Jaschke \(1995\)](#) pour prendre en compte les différences entre la déflexion en z et la déflexion angulaire pour les différents modes de courbure du levier.

D'habitude la 1ère résonance du levier est utilisée, puisqu'elle est de plus grande amplitude, et donc aura le meilleur rapport signal-bruit. Cependant pour des leviers mous dans le liquide, la 1ère résonance se trouvant à 7 kHz est peu visible dû aux bruits environnementaux/acoustiques. C'est pourquoi nous utilisons la seconde résonance. Dans le liquide, un coefficient de correction c doit être rajouté à la valeur de k ($c_1 = 0.871$ pour le 1er pic, $c_2 = 0.256$ pour le 2ème pic...)

La constante de raideur s'exprime donc :

$$k = c_i k_B T \frac{1}{\langle q^2 \rangle} \quad (2.4)$$

où c_i est un facteur de correction prenant en compte les modes de vibration d'un levier rectangulaire et $\langle q^2 \rangle$ l'aire sous la courbe des fluctuations.

2.2.3 Modèles de contact (Hertz)

La théorie de contact de Hertz est l'approche la plus commune pour analyser la mécanique du contact. Cette approche suppose que les matériaux en contact sont linéaires élastiques (les indentations relatives sont petites), isotropes et axisymétriques. Ce modèle s'applique au contact de deux sphères de rayons différents.

La théorie du contact de Hertz a été généralisée par [Sneddon \(1965\)](#) à n'importe quelle géométrie et en particulier au cas du cône indentant une surface plane. La relation force-déplacement obéit à une loi de puissance $F \propto \delta^n$ avec n qui dépend de la géométrie de la pointe.

La force de contact entre une pointe sphérique et un matériau s'écrit :

$$F_{\text{sphère}} = \frac{4}{3} \frac{E}{1 - \nu^2} \sqrt{R} \delta^{3/2} \quad (2.5)$$

où F est la force d'indentation appliquée à l'échantillon, E le module d'Young, ν est le coefficient de Poisson ($\nu = 0.5$ pour des matériaux incompressibles), δ l'indentation et R le rayon de la sphère.

La force appliquée pour un cône s'écrit :

$$F_{\text{cône}} = \frac{2}{\pi} \frac{E}{1 - \nu^2} \tan \theta \delta^2 \quad (2.6)$$

où θ est le demi-angle du cône.

Dans le modèle de Sneddon, l'indentation doit être suffisamment large pour que la pointe du cône soit considérée pointue. Le modèle de Sneddon est souvent utilisé pour ajuster des données provenant de cellules. En 1971, le modèle JKR (Johnson,

Kendall et Roberts) ([Johnson et al., 1971](#)) a encore étendu la théorie de contact pour le cas de contacts adhésifs.

Un modèle de contact pour des pyramides à quatre côtés idéales a été développé numériquement par [Bilodeau \(1992\)](#) à partir du modèle généralisé de Hertz :

$$F = \frac{3}{4} \frac{E}{1 - \nu^2} \tan \theta \delta^2 \quad (2.7)$$

où F est la force d'indentation appliquée à l'échantillon, E le module d'Young, ν est le coefficient de Poisson, δ l'indentation et θ le demi-angle de la pyramide. C'est ce modèle que nous utiliserons.

Pour sonder les propriétés mécaniques de cellules vivantes, plusieurs chercheurs ont choisi d'utiliser un levier avec une pointe sphérique de rayon variant entre 1 et 10 μm ([Dimitriadis et al., 2002](#); [Mahaffy et al., 2000](#)), alors que d'autres ont fait le choix d'une pointe pyramidale pour une plus grande résolution spatiale ([Alcaraz et al., 2003](#)). Les propriétés mécaniques sont déduites en ajustant les données des courbes de force avec le modèle de contact approprié. Bien qu'une sphère donne une géométrie de contact simple pour sonder la mécanique de la cellule, l'utilisation de cette géométrie entraîne une faible résolution spatiale, et la méthode est plus sensible à l'adhésion (dans ce cas utiliser JKR).

Dans notre étude, nous avons fait le choix d'utiliser des pointes pyramidales pour pouvoir sonder localement les propriétés mécaniques des cellules et avoir une mesure précise de l'indentation initiale. Par la suite nous verrons une comparaison entre la pointe pyramidale et une pointe sphérique (de rayon 6 μm) sur des gels de polyacrylamide.

Lorsqu'un taux de déformation constant est appliqué sur un fluide Newtonien, il répond avec une contrainte proportionnelle :

2.2.4 Mesure de la viscoélasticité en mode "modulation de force"

Une indentation initiale δ_0 est appliquée et une oscillation sinusoïdale de petite amplitude δ est rajoutée autour de cette position d'équilibre à différentes fréquences (Fig. 2.11). Dans le mode de modulation de force, la déflexion d et la hauteur Z sont mesurées grâce à la détection du laser réfléchi sur le levier.

2.2.4.1 Mesure du module de cisaillement

Dans notre étude, la pointe pyramidale reste au contact avec l'échantillon. La force appliquée s'écrit selon l'équation 2.7.

Les mesures AFM en contact fournissent deux données : la déflexion d et la hauteur du piézo Z sur lequel est posé le levier sous la forme $d = f(Z)$. La force F et l'indentation de la pointe dans l'échantillon δ sont ensuite déduites à partir de ces deux données :

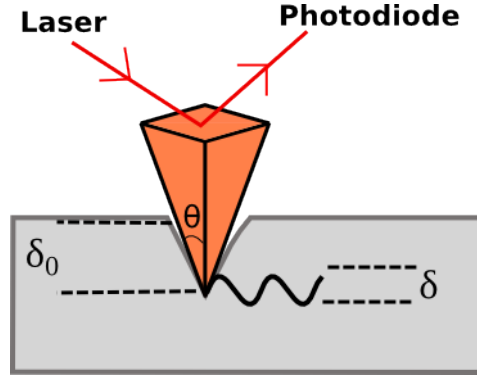


FIGURE 2.11 – Modulation de force. La pointe pyramidale, de demi-angle $\theta = 18.75^\circ$, indente la surface d'une profondeur δ_0 et des oscillations de petites amplitudes δ sont rajoutées.

- La force qui fait fléchir le levier est obtenue par une loi de Hooke $F = k d$ où k est la constante de raideur du levier et d est la déflexion.
- L'indentation δ correspond à la distance lorsque le levier indente l'échantillon, comme montré en Fig.2.12, et l'indentation initiale s'exprime par la relation $\delta_0 = \Delta Z - d = (Z_1 - Z_2) - d$.

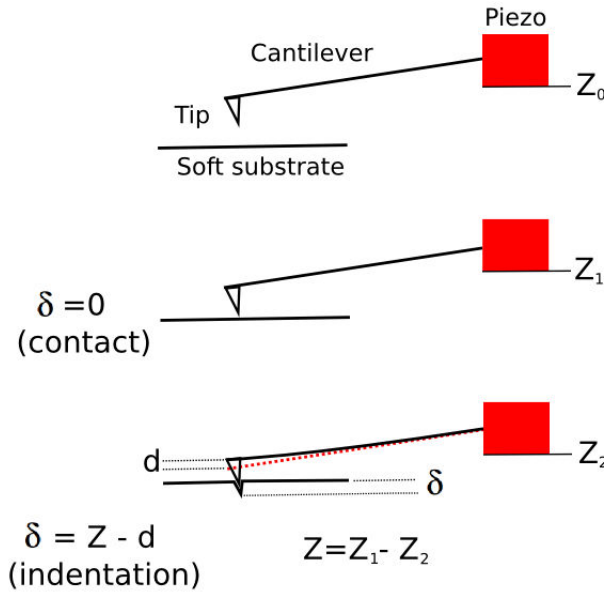


FIGURE 2.12 – Schéma de l'approche du levier vers la surface. Au contact de la pointe à la surface, $Z = Z_1$ ($d = 0$) et lorsque la pointe indente l'échantillon (Z_2), il y a une déflexion d . L'indentation se calcule donc par $\delta_0 = \Delta Z - d = (Z_1 - Z_2) - d$

Pour mesurer les propriétés viscoélastiques des cellules, un signal sinusoïdal de faible amplitude (~ 50 nm) perpendiculaire à la surface de l'échantillon est appliqué autour de l'indentation initiale δ_0 . La modulation est effectuée grâce à un amplificateur à détection synchrone² qui amplifie les signaux de faible amplitude et qui sont modulés par un filtre passe-bas. Cette technique permet de s'affranchir du bruit.

2. Lock-in amplifier

L'équation 2.7 peut être ainsi linéarisée pour de faibles amplitudes autour de δ_0 avec le développement en série de Taylor en ne prenant que le premier terme (Mahaffy et al., 2000) :

$$F_0 + F = \frac{3}{4} \frac{E}{1 - \nu^2} \tan \theta (\delta_0 + \delta)^2 \quad (2.8)$$

$$F_0 + F = \frac{3}{4} \frac{E}{1 - \nu^2} \tan \theta (\delta_0^2 + 2\delta_0 \delta + \dots) \quad (2.9)$$

$$F = \frac{3}{2} \frac{E}{1 - \nu^2} \tan \theta \delta_0 \delta \quad (2.10)$$

Cette équation est réécrite en variables complexes du fait que F et δ sont sinusoïdaux

$$\begin{cases} \delta^*(\omega) = \delta e^{i\omega t} \\ F^*(\omega) = F e^{i(\omega t + \phi)} \end{cases} \quad (2.11)$$

En exprimant l'équation 2.10 en fonction de $G^* = E^*/2(1 + \nu)$ (Landau and Lifshitz, 1986), le module de cisaillement complexe G^* s'écrit de la façon suivante :

$$G^*(\omega) = \frac{1 - \nu}{3 \delta_0 \tan \theta} \frac{F^*(\omega)}{\delta^*(\omega)} \quad (2.12)$$

où $\omega = 2\pi f$ est la pulsation, δ_0 l'indentation initiale et θ le demi-angle de la pointe. Les rapports entre la force et l'indentation sont déduits des amplitudes mesurées de déflexion $d = A e^{i(\omega t + \phi)}$ et la hauteur $Z = Z_0 e^{i\omega t}$ (Fig. 2.13), puis on a $\delta = Z - d$ et $F = kd$.

2.2.4.2 Correction de la traînée hydrodynamique

Dans les expériences de contact dynamique en milieu liquide, il est nécessaire de prendre en compte la contribution de la traînée hydrodynamique liée aux frictions visqueuses du levier dans le liquide.

Pour ce faire, nous avons utilisé une méthode de correction proposée par Alcaraz et al. (2002). Cette méthode consiste à mesurer la contribution de la traînée à différentes hauteurs fixes (h) du substrat afin d'obtenir un facteur de correction $b(h)$. Une extrapolation de ce facteur à $h=0$ permet d'obtenir la correction nécessaire.

Le comportement microrhéologique de l'échantillon et le comportement viscoélastique du liquide sont séparés et caractérisés par des fonctions de transfert dans le domaine des fréquences $H_s(f)$ et $H_d(f)$ respectivement. Les fonctions de transfert sont définies comme le rapport de la force $F^*(f)$ et l'indentation $\delta^*(f)$ complexes : $H_s = F^*/\delta^*$ et $H_d = F_d^*/\delta^*$ où F_d est la force de traînée.

Aux fréquences inférieures à la fréquence de résonance du levier (pour le levier C, $f_0 \sim 7\text{kHz}$), il est possible de caractériser une fonction de transfert globale $H = F^*/\delta^*$:

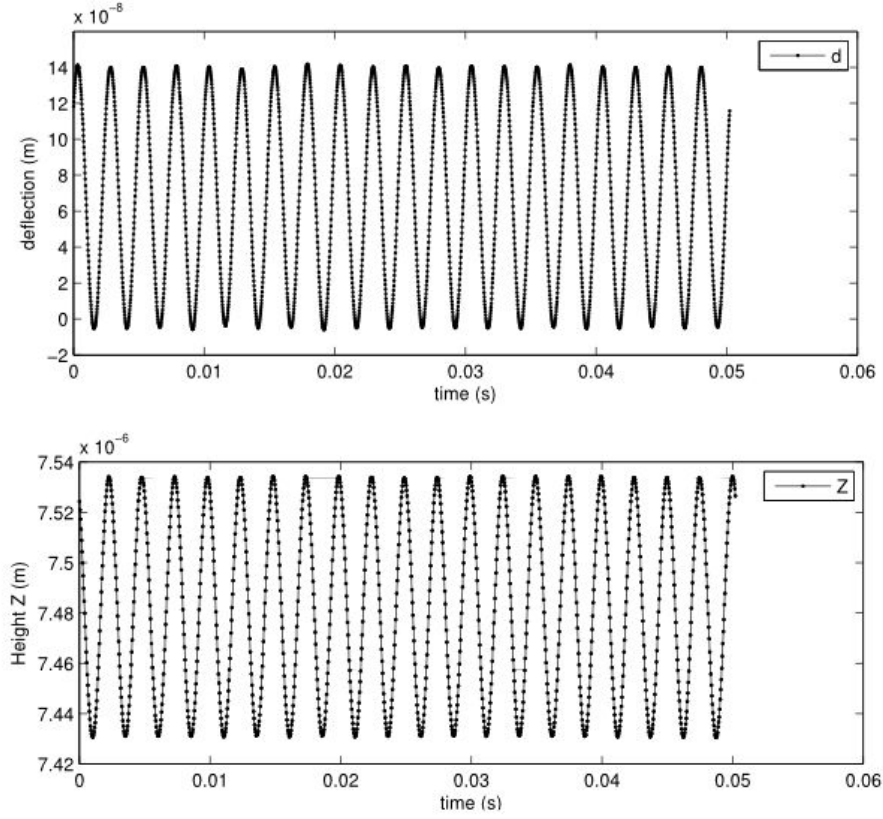


FIGURE 2.13 – Courbes de déflexion d et hauteur Z obtenues par AFM en modulation de force à $f = 398\text{ Hz}$. A partir de ces données, il est possible de remonter à l'indentation $\delta = Z - d$ et la force $F = kd$ et d'en déduire ainsi le module de cisaillement par l'équation 2.12.

$$H(f) = H_s(f) + H_d(f) \quad (2.13)$$

Loin de l'échantillon, $H_s = 0$ et la fonction de transfert $H_d = H(f)$ s'exprime selon l'équation 2.14 :

$$H_d * (f) = H'_d + iH''_d(f) = \frac{F^*(f)}{\delta^*(f)} \quad (2.14)$$

Ainsi la réponse en force du levier à des oscillations de petites amplitudes est mesurée à différentes fréquences en fonction de la distance de séparation pointe-échantillon h . La force de traînée dépend de la géométrie de la pointe, du facteur de traînée $b(0)$ et de la vitesse de l'extrémité libre du levier $v = d\delta/dt = i\omega\delta$. Elle peut être exprimée par $F_d = b(0)v$ pour un petit nombre de Reynolds et la fonction de transfert correspondante s'écrit :

$$H_d(f) = 2\pi i f b(h) \quad (2.15)$$

où $i = \sqrt{-1}$.

Ainsi, en obtenant l'évolution de H_d en fonction de la fréquence, le facteur de

correction $b(h)$ peut être mesuré par un ajustement linéaire de H_d'' à différentes hauteurs fixes.

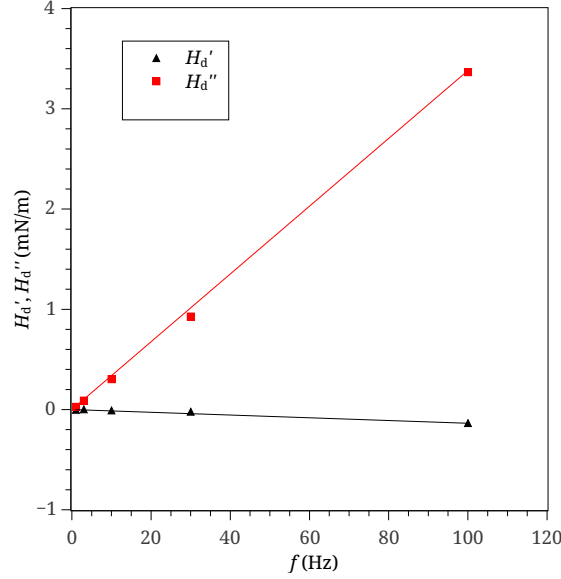


FIGURE 2.14 – La partie réelle H_d' (noir) et la partie imaginaire H_d'' (rouge) de la fonction de transfert due à la traînée visqueuse d'un levier triangulaire. Les expériences ont été effectuées dans de l'eau ($\eta = 10^{-3}$ Pa.s à 25°C) à différentes fréquences d'oscillation et différentes hauteurs fixes (ici $h=3$ μm). Les lignes sont l'ajustement linéaire de l'équation 2.15 pour en déduire le coefficient $2\pi b(h)$ ($r^2 = 0.999$).

Les expériences ont été effectuées dans de l'eau ($\eta = 10^{-3}$ Pa.s à 25°C) au dessus d'une lamelle en verre préalablement nettoyée à l'éthanol. La figure 2.14 montre la partie réelle et imaginaire de H_d à la hauteur $h = 3\mu\text{m}$. La partie imaginaire H_d'' augmente linéairement avec la fréquence d'oscillation alors que la partie réelle peut être négligée. Un ajustement linéaire est effectué pour en déduire le facteur b à $h = 3$ μm et cette opération est répétée pour différentes hauteurs : $h=[0.6-0.8-1-2-3$ $\mu\text{m}]$ (Fig.2.15). On observe que $b(h)$ augmente quand on se rapproche de la surface ($h \rightarrow 0$).

La force de traînée d'une sphère de rayon R dans un liquide prêt d'une paroi à une distance h très petite par rapport à R est définie analytiquement (Cox and Brenner, 1967) par la relation suivante :

$$F_d = \frac{6\pi\eta R^2 v}{h} = b(h)v \quad (2.16)$$

où η est la viscosité, R le rayon de la sphère, h la distance entre la sphère et l'échantillon et v la vitesse relative entre la sphère et le liquide $v = d\delta/dt = \omega\delta$. Le facteur $b(h)$ augmente plus on s'approche de la surface.

Il est possible d'appliquer ce modèle à des géométries plus complexes comme les pointes pyramidales en prenant en compte un rayon effectif a_{eff} , une hauteur effective h_{eff} (Alcaraz et al., 2002) et le facteur de traînée s'écrit ainsi :

$$b(h) = \frac{6\pi\eta a_{\text{eff}}^2 v}{h + h_{\text{eff}}} \quad (2.17)$$

où η la viscosité dynamique du milieu, et a_{eff} et h_{eff} sont les paramètres d'ajustement qui prennent en compte l'effet de la géométrie du levier.

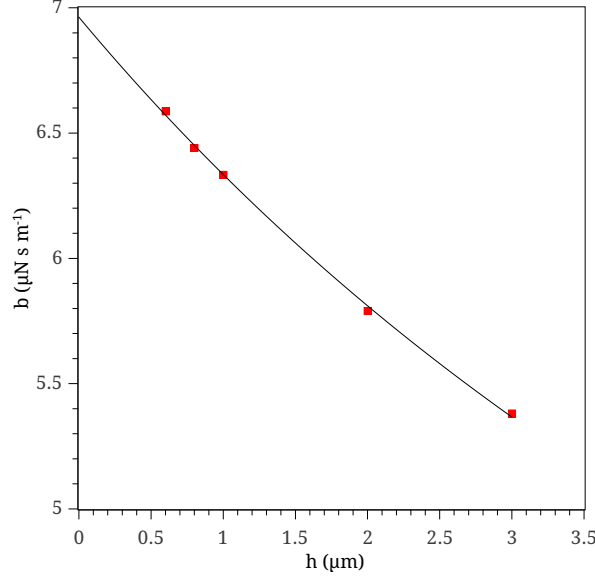


FIGURE 2.15 – Le facteur de traînée $b(h)$ en fonction de la distance à la surface h . La ligne est l'ajustement des points selon l'équation 2.17. L'extrapolation du fit à $h=0$ donne le coefficient de traînée $b(0) = 6.95 \times 10^{-6} \text{ N.s.m}^{-1}$

Le facteur de traînée à $h = 0$ est extrapolé à partir de ce fit et on trouve la valeur $b(0) = 6.95 \times 10^{-6} \text{ N.s.m}^{-1}$.

On obtient ainsi le module de cisaillement complexe avec la partie imaginaire corrigée (où $i = \sqrt{-1}$) :

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + i G''(\omega) = \frac{1 - \nu}{3 \delta_0 \tan \theta} \left(\frac{F^*(\omega)}{\delta^*(\omega)} - i \omega b(0) \right) \quad (2.18)$$

2.2.4.3 Correction de l'effet du substrat

Les mesures mécaniques sont effectuées à plusieurs positions de la cellule, il faut donc utiliser des leviers mous (quelques mN/m) pour appliquer des forces inférieures à 1 nN. Il faut donc prendre en compte l'épaisseur des cellules. Dans notre cas, $h_{\text{noyau}} \cong 10 \mu\text{m}$, $h_{\text{périnoyau}} \cong 1 \mu\text{m}$ et $h_{\text{périphérie}} \cong 200 \text{ nm}$ et l'indentation du levier est $\delta_{\text{noyau}} = 500 \text{ nm}$, $\delta_{\text{périnoyau}} = 400 \text{ nm}$, $\delta_{\text{périphérie}} = 100 \text{ nm}$ respectivement. L'indentation maximale pour mesurer des échantillons mous sans sentir l'influence du substrat dur est de 10 – 20%. Pour le noyau, nous sommes en dehors de cette marge d'erreur, mais pour le périnoyau et la périphérie, ce n'est pas le cas. Il faut donc effectuer des corrections.

L'effet du substrat a déjà été mis en évidence pour des pointes sphériques (Dimitriadis et al., 2002; Mahaffy et al., 2004). Récemment Santos *et al* (Santos et al., 2012) ont corrigé l'effet du substrat sur des pointes coniques en utilisant une validation avec un modèle aux éléments finis. Ils proposent une fonction de correction $g(\chi)$ avec $\chi = (\delta_0 \tan \theta)/h$ et la relation de force-déplacement $(F - \delta)$ pour des pointes coniques peut être décrite par $F = F_{\text{Hertz}}(\delta)g(\chi)$ où F_{Hertz} est donné par le modèle de Hertz usuel pour les cônes (la seule différence avec l'équation pour les pyramides est le coefficient : $3/4$ au lieu de $2/\pi$). La correction est valable si le substrat est très rigide. Santos et al. (2012) ont effectué cette correction sur le module d'Young, nous effectuons donc une linéarisation de la fonction de correction autour de l'indentation initiale δ_0 .

La fonction de correction donnée par Santos et al. (2012) :

$$g_B(\chi) = 1 + 0.6298\chi + 0.7236\chi^2 + 1.249\chi^3 - 0.3556\chi^4 \quad (2.19)$$

Avec $\chi = \delta \tan \theta / h$

Ainsi, la force appliquée pour une géométrie pyramidale (indentation initiale δ_0) s'écrit :

$$F_0 = \frac{3}{4} \frac{E \tan \theta}{1 - \nu^2} \delta_0^2 g_B(\chi_0) \quad (2.20)$$

avec

$$\chi_0 = \frac{\delta_0 \tan \theta}{h} \quad (2.21)$$

Si on effectue une linéarisation autour de la position d'équilibre, nous obtenons l'équation suivante :

$$F_0 + F = \frac{3}{4} \frac{E \tan \theta}{1 - \nu^2} (\delta_0 + \delta)^2 g_B\left(\frac{\delta_0 \tan \theta}{h} + \frac{\delta \tan \theta}{h}\right) \quad (2.22)$$

$$F_0 + F = \frac{3}{4} \frac{E \tan \theta}{1 - \nu^2} (\delta_0^2 + 2\delta_0\delta + \delta^2) \left(g_B(\chi_0) + \frac{\delta \tan \theta}{h} g'_B(\chi_0)\right) \quad (2.23)$$

Les amplitudes sont très faibles, nous ne prenons donc en compte que les premiers termes du développement en série ($g'_B = \frac{dg_B}{d\chi}$) :

$$F_0 + F = \frac{3}{4} \frac{E \tan \theta}{1 - \nu^2} (\delta_0^2 g_B(\chi_0) + 2\delta_0 \delta g_B(\chi_0) + \delta_0^2 \delta \frac{\tan \theta}{h} g'_B(\chi_0)) \quad (2.24)$$

En tenant compte des équations 2.20 et 2.21, on obtient

$$F = \frac{3}{4} \frac{E \tan \theta}{1 - \nu^2} (2\delta_0 \delta g_B(\chi_0) + \chi_0 \delta_0 \delta g'_B(\chi_0)) \quad (2.25)$$

$$F = \frac{3}{4} \frac{E \tan \theta}{1 - \nu^2} \delta (2\delta_0 g_B(\chi_0) + \chi_0 \delta_0 g'_B(\chi_0)) \quad (2.26)$$

En utilisant de nouveau la relation $G^* = E^*/2(1 + \nu)$ et passant dans le plan complexe, l'équation 2.26 s'écrit :

$$F^* = \frac{3 G^* \tan \theta}{1 - \nu} \delta^* (\delta_0 g_B(\chi_0) + \frac{1}{2} \chi_0 \delta_0 g'_B(\chi_0)) \quad (2.27)$$

Ainsi le module corrigé G_c^* s'écrit :

$$G_c^* = \frac{1 - \nu}{3 \delta_0 \tan \theta} \frac{F^*}{\delta^*} \left(g_B(\chi_0) + \frac{\chi_0}{2} g'_B(\chi_0) \right)^{-1} \quad (2.28)$$

Calculons la fonction de correction $(g_B(\chi_0) + \frac{\chi_0}{2} g'_B(\chi_0))$:

$$g_B(\chi_0) = 1 + 0.6298\chi_0 + 0.7236\chi_0^2 + 1.249\chi_0^3 - 0.3556\chi_0^4 \quad (2.29)$$

et la dérivée de g_B par rapport à χ_0 (avec $\chi_0 = \frac{\delta_0 \tan \theta}{h}$) est :

$$g'_B(\chi_0) = \frac{dg_B}{d\chi_0} = 0.6298 + 2 \times 0.7236\chi_0 + 3 \times 1.249\chi_0^2 - 4 \times 0.3556\chi_0^3 \quad (2.30)$$

$$\frac{\chi_0}{2} g'_B(\chi_0) = \frac{1}{2} 0.6298\chi_0 + 0.7236\chi_0^2 + \frac{3}{2} 1.249\chi_0^3 - \frac{4}{2} 0.3556\chi_0^4 \quad (2.31)$$

Le facteur de correction s'écrit donc :

$$g[\chi(\delta_0, h)] = g_B(\chi_0) + \frac{\chi_0}{2} g'_B(\chi_0) = 1 + 0.945\chi_0 + 1.447\chi_0^2 + 3.108\chi_0^3 - 1.0668\chi_0^4 \quad (2.32)$$

Les corrections effectuées sur les mesures G' et G'' sont les mêmes, et sont représentées dans le tableau 2.1

2.3 Validation du protocole en utilisant des gels de polyacrylamide

Avant d'utiliser le protocole pour mesurer les propriétés dynamiques par AFM de cellules cancéreuses, une validation du protocole est effectuée en mesurant les

Position	h	δ_0	χ_0	Correction
Noyau	10 μm	500 nm	0.016	1.01
Périnoyau	1 μm	400 nm	0.14	1.1624
Périphérie	200 nm	100 nm	0.17	1.2164

TABLE 2.1 – Hauteur du noyau, périnoyau et périphérie avec les indentations initiales δ_0 respectives et les corrections correspondantes. $\chi_0 = \delta_0 \tan \theta / h$ est le facteur de forme avec $\theta = 18.75^\circ$ et $\tan(\theta) = 0.3395$. La correction faite sur le noyau est négligeable.

propriétés de gels de polymère par AFM et avec une autre technique.

Pour ce faire, nous avons choisi des gels de polyacrylamide de quatre concentrations différentes et les modules G' et G'' ont été mesurés avec un rhéomètre classique dans la gamme de fréquences $[10^{-3} - 5 \text{ Hz}]$ et avec l'AFM suivant notre technique de mesure dans la gamme de fréquences $[1 - 500 \text{ Hz}]$. Nous avons ainsi la possibilité de faire coïncider les mesures dans le domaine des faibles fréquences. Un article a été publié sur ces résultats ([Abidine et al., 2015a](#)).

2.3.1 Matériels et méthodes

2.3.1.1 Méthodes de mesure : AFM et rhéomètre classique

Les expériences dynamiques sont effectuées avec deux techniques dans deux gammes de fréquences différentes :

- Un AFM Nanowizard II (JPK Instruments, Berlin, Germany) permet d'obtenir le module d'Young E en mode statique et les modules élastiques G' et visqueux G'' dans la gamme de fréquence $[1 - 500 \text{ Hz}]$, selon la technique décrite précédemment. Nous gardons une force appliquée inférieure à 3 nN pour rester dans le domaine linéaire.
- Les mesures de rhéométrie sont effectuées avec un rhéomètre plan-plan (Malvern, Gemini 150) à de faibles fréquences $[0.001 - 5 \text{ Hz}]$ dans le régime linéaire (déformation de 1%).

2.3.1.2 Gels de polyacrylamide

Les polymères exhibent un comportement rhéologique intéressant : ces matériaux peuvent se comporter successivement comme des liquides, puis comme des matériaux élastiques avec un plateau et suivent une transition vitreuse avant d'atteindre le domaine solide ([Larson, 1999](#)). Ces processus dépendent de la température. A cause de ces propriétés très variées, les polymères sont utilisés en masse dans les applications industrielles. Cependant, il est souvent difficile de caractériser les propriétés de ces matériaux puisque la gamme des fréquences couvre plusieurs décades ([Baumgaertel et al., 1992](#); [Palade et al., 1996](#)).

Les gels de polymères partagent les mêmes propriétés que les polymères du fait de la réticulation de leur réseau. Nous avons choisi de valider notre protocole AFM

sur des gels de polyacrlamide car il y a une relation directe entre la concentration en composants et les propriétés mécaniques. Les gels de polyacrylamide sont synthétisés en mélangeant de l'acrylamide (30%w/w) à quatre concentrations différentes (5 - 7.5 - 10 - 15 %) et 1%w/w de N,N-méthylène-bis-acrylamide à une concentration fixée de 0.03% dans de l'eau distillée. Les gels de polyacrylamide sont faiblement réticulés. La polymérisation est initiée en incorporant deux catalyseurs : le N,N,N,N-tetraméthyle-éthylènediamine (Temed, Sigma) et 10% de persulfate d'ammonium (APS). Les gels ont une hauteur de 70 μm pour éviter l'influence du verre sur nos mesures. Nous n'utilisons donc pas la correction décrite dans la section 2.2.4.3.

2.3.2 Comparaison entre les pointes pyramidales et sphériques

En fonction de l'environnement, des conditions physiologiques et du type cellulaire, la forme des cellules est ronde ou étalée. Le choix de la pointe AFM dépend de la morphologie du matériau et de ce que l'on cherche à mesurer. Dans notre cas, on utilise des substrats 2D plans. Plusieurs géométries de pointes sont disponibles pour les mesures d'indentation : cylindre, sphère, pyramide, cône, etc. Afin de décider de la meilleure pointe à utiliser pour nos expériences, des mesures dynamiques ont été effectuées avec des pointes pyramidales de constante de raideur et fréquence de résonance différente (pointe C et F) et une pointe sphérique (rayon de 6 μm). Seule la comparaison entre la pointe sphérique et pyramidale est présentée ici.

Les mesures ont été faites sur un même gel de polyacrylamide de concentration 10% d'acrylamide et 0.03% de bis-acrylamide (Fig. 2.16).

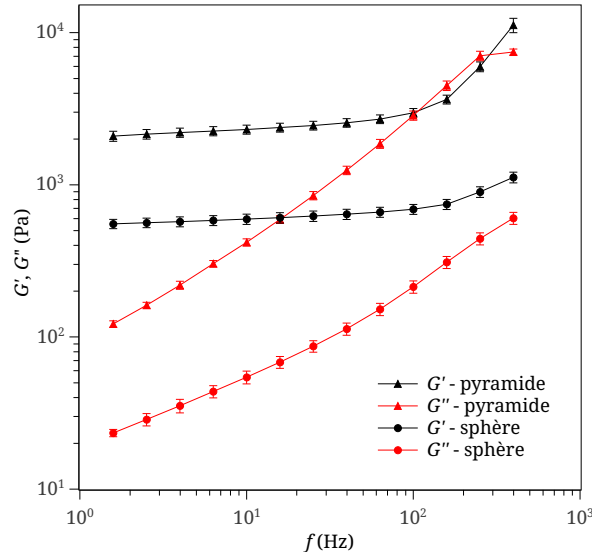


FIGURE 2.16 – Comparaison des modules G' et G'' d'un gel de polyacrylamide de concentration 10% en acrylamide et 0.03% en bis-acrylamide avec une pointe pyramidale (levier C, $k = 0.01\text{N/m}$) et une bille sphérique ($R = 6\mu\text{m}$). Les mesures dépendent de la géométrie de la sonde.

Les modules G' et G'' dépendent bien de la géométrie de la sonde, et les mesures avec la bille sont inférieures de plus d'une décade à celles obtenues avec une pyramide.

La raison pour laquelle les pointes pyramidales donnent des estimations du module élastique de gels plus grandes que celles mesurées avec une sphère est un sujet de controverse. Plusieurs études montrent que ces différences peuvent être attribuées à des artefacts dans le processus de mesure dont un phénomène de rigidification quand la contrainte augmente (Dimitriadis et al., 2002; Costa and Yin, 1999), la détermination du point de contact (Dimitriadis et al., 2002), l'incertitude sur l'aire de contact (Harris and Charras, 2011) et l'interaction avec le substrat. Ces artefacts sont d'autant plus importants que l'indentation est grande. Harris and Charras (2011) ont suggéré de faire toutes les mesures < 600 nm pour minimiser ces effets.

La distribution des contraintes obtenue avec la pointe pyramidale est beaucoup plus importante que celle de la pointe sphérique. Quelques chercheurs pensent que cela serait dû à de grandes indentations qui augmentent l'aire de contact. Cependant pour des indentations faibles, le module mesuré par des pyramides n'augmente pas considérablement (Vargas-Pinto et al., 2013). Il semble que l'adhésion joue aussi un rôle (JKR) et l'aire de contact avec la sphère est plus grande. Dans notre cas, nous souhaitons effectuer des mesures locales sur des cellules, il est donc essentiel d'utiliser une pointe pyramidale. C'est pourquoi nous avons comparé des mesures locales des modules par AFM et des mesures de gels globales par rhéométrie classique, afin de valider ces questions.

2.3.3 Comparaison du module d'Young et du module de cisaillement

Le module d'Young est relié au module de cisaillement par la relation $G = \frac{E}{2(1+\nu)}$ où $\nu = 0.5$ est le coefficient de Poisson. Ici, nous considérons que le substrat est incompressible et $\nu = 0.5$, ainsi, $E = 3G$. Aux faibles fréquences, $G' \gg G''$, et il est logique de dire que $E \sim 3G'(1Hz)$.

Nous souhaitons valider cette relation entre le module d'Young et le module de cisaillement élastique aux petites fréquences. Pour ce, des mesures statiques et dynamiques sont effectuées sur un gel de polyacrylamide de concentration 10% et les valeurs sont comparées (Fig. 2.17).

Le module d'Young est déduit de l'ajustement du modèle de Hertz sur une courbe de force selon l'équation 2.7.

Pour le gel 10%, la valeur moyenne du module d'Young est de $\langle E \rangle = 7111$ Pa et celle du module de cisaillement élastique est de $\langle G'(1Hz) \rangle = 2315$. Ainsi, la relation $E \sim 3G'$ aux petites fréquences pour des matériaux incompressible élastique ($\nu \sim 0.5$) est validée. Ceci nous conforte dans le fait que les mesures dynamiques et statiques sont complémentaires.

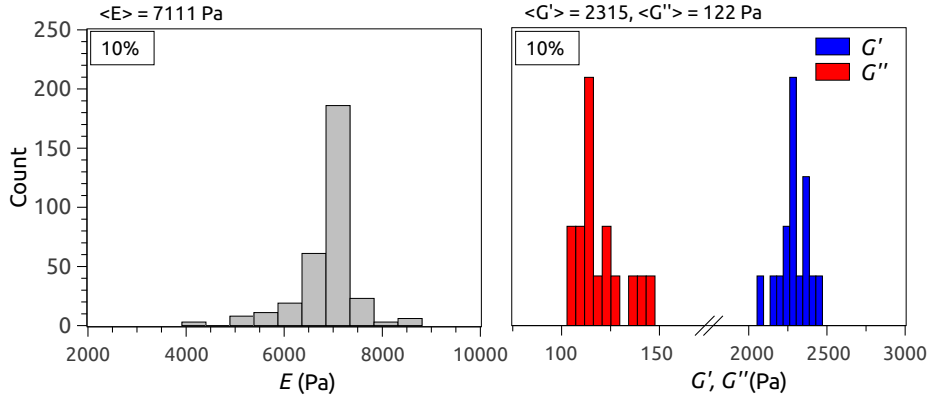


FIGURE 2.17 – Histogrammes montrant les propriétés rhéologiques du gel de polyacrylamide 10% : module d'Young (E) et les modules dynamiques G' et G'' à 1 Hz. $E = 7111 \pm 34$ Pa et $G' = 2315 \pm 25$ Pa. La relation $E \sim 3G'$ est confirmée pour des matériaux élastiques incompressibles.

2.3.4 Résultats

2.3.4.1 Microrhéologie de gel de polyacrylamide

La superposition des mesures effectuées avec un rhéomètre aux faibles fréquences et un AFM en modulation de force aux hautes fréquences montre une concordance pour tous les gels (Fig. 2.18) autour de 2 Hz pour la concentration 10%.

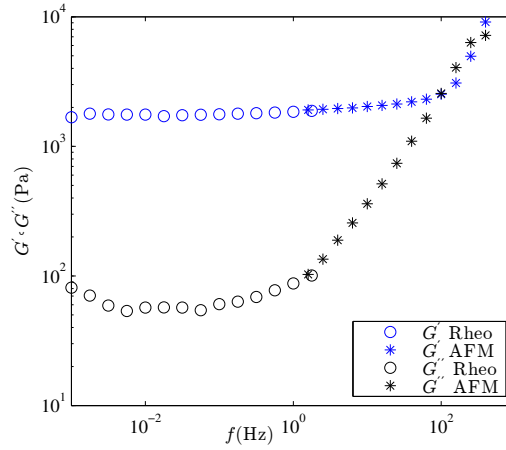


FIGURE 2.18 – Superposition des mesures effectuées avec un rhéomètre (cercle) et par AFM (étoile) pour des gels de polyacrylamide de concentration 10% à $T = 25^\circ\text{C}$.

Le module élastique de cisaillement G' (Fig. 2.18 et 2.19) exhibe un plateau (G_N^0) aux faibles fréquences ($G_N^0 = 2300\text{ Pa}$). Puis aux hautes fréquences, le gel effectue une transition vitreuse avec deux modules G' et G'' qui évoluent en loi de puissance avec a légèrement inférieur à 1.

2.3.4.2 Modèle rhéologique aux dérivées fractionnaires

Pour prédire et comprendre le comportement observé sur une large gamme de fréquences, un modèle rhéologique est utilisé combinant deux modèles linéaires aux petites et hautes fréquences. Le module complexe de cisaillement $G^*(\omega)$ est relié à une fonction continue de relaxation $H(\lambda)$ en utilisant le formalisme introduit par [Baumgaertel et al. \(1992\)](#) :

$$G_f^*(\omega) = \int_0^\infty H(\lambda) \frac{i\omega\lambda}{1 + i\omega\lambda} \frac{d\lambda}{\lambda} \quad (2.33)$$

$H(\lambda)$ est le spectre continu de relaxation qui modélise la réponse viscoélastique linéaire d'un liquide jusqu'au début de l'état vitreux. En particulier, le régime fluide, aux petites fréquences, est décrit par la fonction $H_f(\lambda)$:

$$H_f(\lambda) = \begin{cases} n_f G_N^0 \left(\frac{\lambda}{\lambda_{\max}} \right)^{n_f} & \text{if } \lambda \leq \lambda_{\max} \\ 0 & \text{if } \lambda > \lambda_{\max} \end{cases} \quad (2.34)$$

Cette loi de puissance décrit la distribution continue des temps de relaxation pour modéliser le plateau observé en Fig. 2.18 aux petites fréquences, alors que G'' diminue avec la pente $-n_f$. Ce modèle n'est pas adapté pour décrire les hautes fréquences, et donc la description BSW ([Baumgaertel et al., 1992](#)) est insuffisante pour prédire les données dans toute la gamme de fréquence d'étude. Pour remédier à ce problème, un modèle aux dérivées fractionnaires ([Bagley and Torvik, 1983](#); [Palade et al., 1996](#)) est rajouté au modèle précédent $G^*(\omega) = G_f^*(\omega) + G_g^*(\omega)$. L'expression correspondante du module de cisaillement $G_g^*(\omega)$ est donnée par :

$$G_g^*(\omega) = G_1 \frac{(i\omega\lambda_1)^b}{1 + (i\omega\lambda_1)^a} \quad (2.35)$$

où a et b sont les ordres des dérivées fractionnaires ([Bagley and Torvik, 1983](#)), avec $0 < a \leq b$ ([Palade et al., 1996](#)). Ce modèle retranscrit bien les pentes de la transition vitreuse.

Les paramètres de ce modèle sont : G_N^0 , λ_{\max} , n_f , a , b , G_1 et λ_1 , présentés sur la Fig. 2.19. G_N^0 est le plateau élastique classique, λ_{\max} est le temps de relaxation maximal correspondant au régime liquide. Dans le cas des gels, ce temps spécifique n'existe pas dans notre domaine temporel, puisque les gels de polymère ne coulent pas et exhibent un plateau aux faibles fréquences ([Verdier et al., 2009](#)). $-n_f$ est la pente de G'' aux petites fréquences, et varie entre -0.8 et 0 en fonction du gel. Le paramètre b représente la pente de G' et G'' dans la transition vitreuse (avec $b = a$ en Fig. 2.19). G_1 est le module aux hautes fréquences, et n'est pas représenté sur nos données ([Palade et al., 1996](#)). λ_1 est le temps de relaxation relié à la microstructure et n'apparaît pas dans la Fig. 2.19. $1/\lambda_1$ est la fréquence de transition typique entre le domaine solide et vitreux. Enfin, $b - a$ correspond à la pente limite de G' et G'' aux

Gel	G_N^0 (Pa)	λ_{\max} (s)	n_f	λ_1 (s)	G_1 (Pa)	$a = b$
5%	336	1.5×10^4	0.73	1.3×10^{-4}	1.0×10^4	0.82
7.5%	710	2.0×10^5	0.18	2.4×10^{-4}	1.0×10^4	0.85
10%	2 307	9.0×10^9	0.08	2.4×10^{-4}	2.0×10^4	0.97
15%	8 801	1.0×10^{10}	0.06	2.0×10^{-4}	5.9×10^4	0.98

TABLE 2.2 – Paramètres issus de l’ajustement du modèle rhéologique aux dérivées fractionnaires.

hautes fréquences. Ici, l’ajustement du modèle sur nos mesures montre que $a = b$.

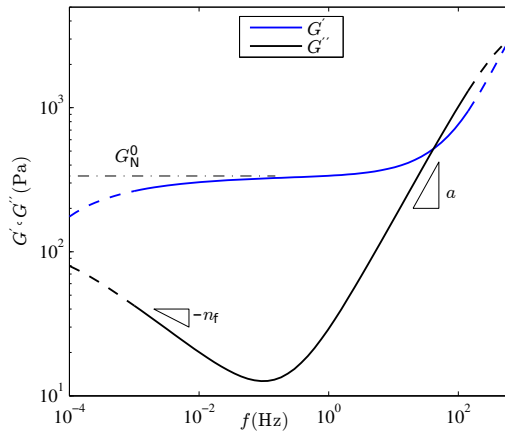


FIGURE 2.19 – Modèle rhéologique : G_N^0 est le plateau élastique, $-n_f$ est la pente de G'' aux petites fréquences, $a = b$ est la pente G' et G'' dans la transition vitreuse. $\omega \sim 1/\lambda_{\max}$ correspond à l’intersection entre G' et G'' aux très petites fréquences (hors de la gamme de fréquences présentée). G_1 correspond au plateau haute fréquence pour $G' \sim \lambda_1$.

L’ajustement paramétrique du modèle a été effectué sur quatre gels de concentrations différentes caractérisés en rhéométrie et par AFM par Richard Michel (Fig. 2.20). Le modèle est en accord avec l’expérience. Les paramètres d’ajustement ont été déterminés par minimisation avec la méthode de Levenberg–Marquardt. Les meilleurs paramètres sont représentés dans la table 2.2.

2.3.5 Discussion

Le plateau élastique G_N^0 augmente avec la concentration en acrylamide c (Fig. 2.21) avec une dépendance en loi de puissance $G_N^0 \sim c^{3.0}$. Des études précédentes (Hecht and Geissler, 1978) observent des exposants de 2.55 alors que la théorie de de Gennes prédit une valeur de 2.25 (de Gennes, 1976). L’exposant pour G_N^0 est proche de 2.55 trouvé pour les gels de collagène (Iordan et al., 2010) et est supérieur à 1.4 obtenu pour des solutions d’actine (Hinner et al., 1998).

Le temps de relaxation maximum λ_{\max} ne semble pas jouer de rôle significatif puisque ce paramètre est relié au croisement de G' et G'' aux très faibles fréquences,

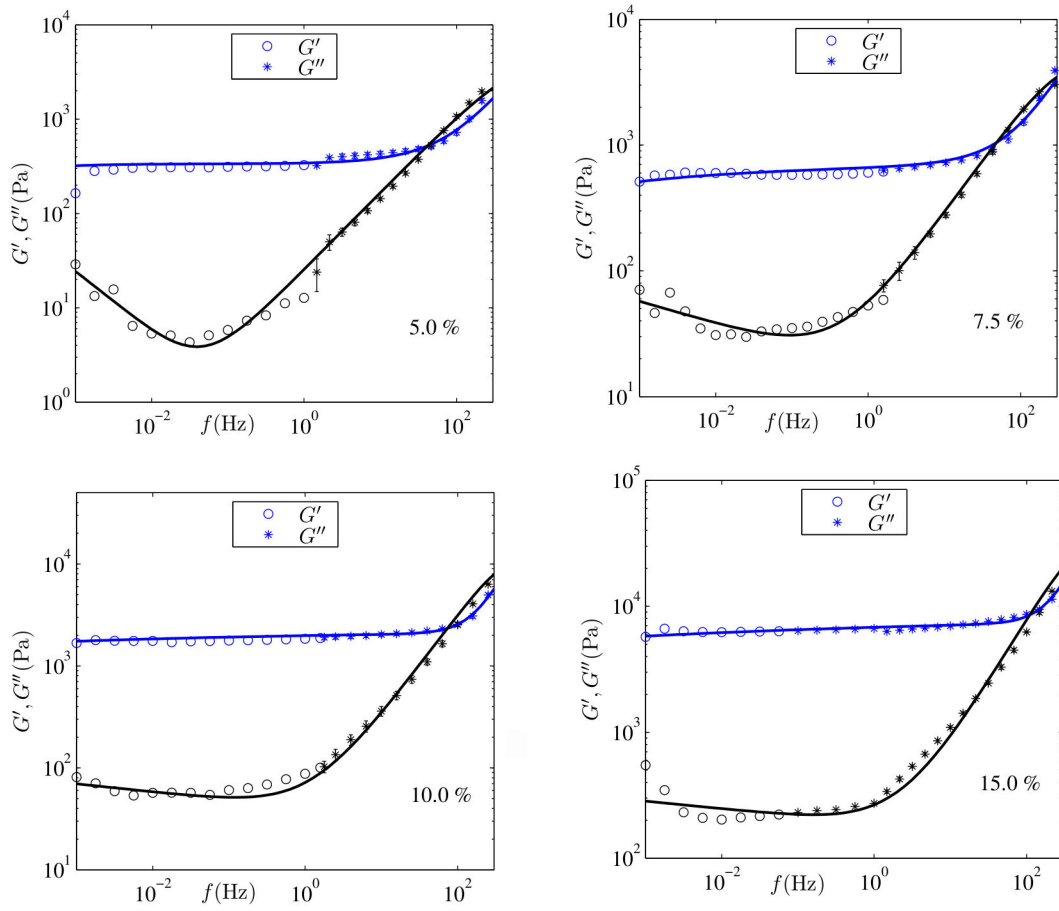


FIGURE 2.20 – Rhéologie des 4 gels de polyacrylamide de concentration différente avec deux techniques : la rhéométrie classique [0.001 - 5 Hz] et l'AFM en force modulation [1-500 Hz]. Les lignes sont l'ajustement du modèle aux dérivées fractionnaires aux données.

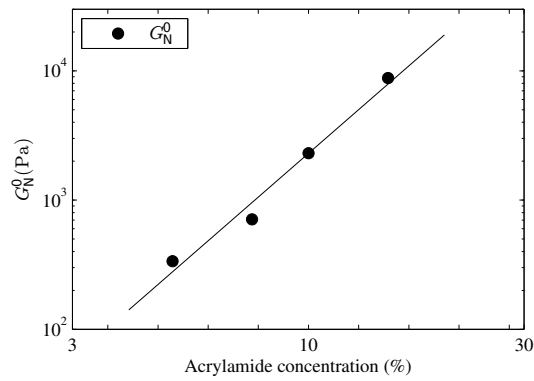


FIGURE 2.21 – Paramètre G_N^0 en fonction de la concentration en acrylamide.

bien en dehors de notre gamme d'étude. Cependant, la pente $-n_f$ est un paramètre important et diminue quand la concentration diminue. Ceci accentue le fait que les gels à haute concentration exhibent des G' et G'' presque plats (concentration 10% et 15% en Fig. 2.20) et ne se croisent pas aux faibles fréquences.

Aux hautes fréquences, la pente $a = b$ varie entre 0.82 et 0.98 (Table 2.2). La dépendance $G', G'' \sim \omega^{3/4}$ suggérée dans la littérature pour les polymères semi-flexibles (Gittes and MacKintosh, 1998) est donc proche de nos résultats.

Quand au paramètre λ_1 , il est presque constant $\sim 2.0 \times 10^{-4}$ s et ne semble pas dépendre de la concentration. Ainsi, on déduit que le comportement des gels aux hautes fréquences est similaire pour toutes les concentrations.

Un paramètre important qui ressort du modèle et des mesures est la fréquence de transition f_T qui correspond à $G' = G''$ dans la zone de transition. A partir de cette fréquence, les modules évoluent avec la même pente. Cette fréquence est associée à un temps de transition $\lambda_T = 1/2\pi f_T$. Quand la concentration augmente, G' exhibe un plateau plus grand et la fréquence de transition augmente de 40 à 190 Hz. C'est donc une signature des propriétés mécaniques du gel.

Au plateau, $G' \sim G_N^0$ et pour les hautes fréquences, en utilisant l'équation 2.35 et $\omega\lambda_1 \ll 1$, le module de cisaillement élastique peut s'écrire de manière approchée $G' \sim G_1 \cos(\pi a/2)(\omega\lambda_1)^a$. La fréquence de transition $f_T = 2\pi\omega_T$ dans notre modèle s'écrit donc (Eq. 2.36) :

$$f_T = \frac{1}{2\pi\lambda_1} \left(\frac{G_N^0}{G_1 \cos(\pi a/2)} \right)^{1/a} \quad (2.36)$$

L'augmentation de f_T avec la concentration est observée dans la Table 2.2 et est confirmée par son expression déduite du modèle et suit une loi de puissance $f_T \sim c^{1.6}$. Cette fréquence de transition caractérise la transition d'un gel de polymère en mettant en évidence des chaînes individuelles qui fluctuent entre les réticulants.

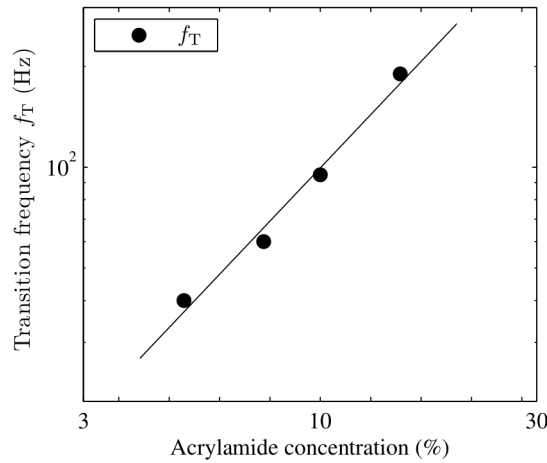


FIGURE 2.22 – Paramètre f_T en fonction de la concentration en acrylamide. L'exposant de la loi en puissance est 1.6 ± 0.1

Le modèle proposé prédit bien les mesures de G' et G'' sur une grande gamme de fréquence. Ce modèle combine un spectre de temps de relaxation aux petites fréquences et un modèle aux fractions dérivées aux hautes fréquences. Plusieurs paramètres qui décrivent les propriétés rhéologiques des gels se révèlent être pertinents, en particulier le plateau élastique G_N^0 , la pente a aux hautes fréquences et la fréquence de transition f_T .

Ainsi il est possible d'utiliser ce modèle pour décrire des propriétés plus complexes comme les cellules. Dans la partie suivante, nous verrons qu'un modèle plus simple rendant compte de tous ces effets a été mis au point. Enfin, cette comparaison permet de valider notre protocole avec une pointe pyramidale.

Chapitre 3

L'influence du cytosquelette et de l'invasivité sur les propriétés viscoélastiques. Application aux cellules cancéreuses de la vessie.

Une fois le protocole validé, nous pouvons sonder les propriétés mécaniques locales de cellules cancéreuses vivantes. Avant de pouvoir étudier le rôle de l'environnement sur les propriétés des cellules cancéreuses en fonction de leur potentiel métastatique, il est nécessaire de comprendre quel composant du cytosquelette influence ces propriétés. Le cytosquelette d'actine semble jouer un rôle primordial sur les propriétés mécaniques des cellules. Après une brève introduction sur le cancer de la vessie et les lignées cellulaires utilisées dans notre étude, le lien entre la microstructure du réseau d'actine et les propriétés mécaniques est mis en évidence ([Abidine et al., 2015b](#)). Ce réseau est ensuite perturbé à l'aide de drogues spécifiques : la LatrunculinA, qui inhibe la polymérisation des filaments d'actine, la drogue Y27632, qui inhibe la contractilité de l'acto-myosine, et enfin la Jasplakinolide qui est supposée stabiliser les filaments d'actine. Nous proposons une version simplifiée du modèle rhéologique aux dérivées fractionnaires présenté dans le chapitre 2 pour pouvoir mettre en évidence des paramètres pertinents afin de décrire les propriétés viscoélastiques de cellules cancéreuses et les variations liées aux drogues et à l'invasivité. Les mesures sont faites localement à trois positions différentes de la cellule : le noyau (N), le périnoyau (P) et la périphérie (E) ¹.

3.1 Le cancer de la vessie

La vessie est un organe vide avec des barrières musculaires flexibles. Sa fonction principale est de stocker l'urine avant qu'elle ne soit éjectée du corps. Le mur de la

1. E pour "edge" en anglais

vessie est constitué de quatre couches principales (Fig. 3.1) :

- Epithélium transitionnel (urothélium) : couche la plus profonde constituée de cellules épithéliales transitionnelles.
- Lamina Propria : fine couche de tissu conjonctif, vaisseaux sanguins et nerfs.
- Muscularis Propria : couche épaisse de muscle.
- Couche de gras qui sépare la vessie du reste des organes.

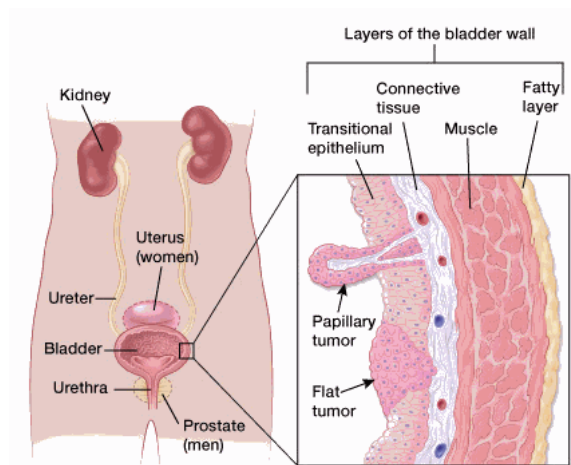


FIGURE 3.1 – Schéma des couches cellulaires de la vessie : l'épithélium transitionnel, le tissu conjonctif, la couche musculaire et la couche de graisse. Plus le cancer traverse les différentes couches (vers l'extérieur) plus il devient difficile à traiter. Source : cancer.org

Connaître les différentes couches de la vessie permet de comprendre comment le cancer de la vessie se développe d'un état bénin à un état métastatique. Les cancers de la vessie commencent, pour la plupart, dans l'épithélium transitionnel. Alors que le cancer se développe à travers les différentes couches, il devient de plus en plus avancé et plus difficile à traiter.

L'un des types cancéreux de la vessie le plus répandu est le carcinome des cellules transitionnelles TCCs (9 cancers sur 10 sont de ce type). Le cancer de la vessie est décrit en fonction de la position des cellules cancéreuses dans le mur de la vessie. Les cellules non-invasives se trouvent dans les couches internes de la vessie (l'épithélium transitionnel) mais n'atteignent pas les couches plus profondes, alors que les cellules invasives se développent dans le tissu conjonctif et même dans la couche de muscle. Ainsi, plus un cancer se développe dans les couches profondes, plus il est invasif.

Les cancers invasifs sont divisés en stades différents (Ta, T1, T2, T3 et T4). Cela correspond à l'étape dans laquelle le cancer se trouve et jusqu'où le cancer s'est étalé. Un cancer au stade Ta et T1 se trouve dans la couche de l'endothélium la plus interne, alors que le stade T2 veut dire que la cellule a atteint le muscle, un cancer T3 a atteint la couche de gras, et le cancer T4 signifie que le cancer s'est propagé en dehors de la vessie.

Le grade du cancer est l'autre paramètre clinique utilisé pour décrire l'invasivité du cancer. Plus le grade est grand, plus le cancer est invasif. Les cancers de

faible grade ont une morphologie de cellules normales. Elles sont bien différenciées et restent dans la couche de l'endothélium. Alors que les cancers à haut grade ont une morphologie anormale et sont peu différenciés.

Dans mon étude, je sonde les propriétés mécaniques de cellules provenant de TCC de la vessie de différentes invasivités : RT112, T24 et J82 (ATCC, Rockville, MD). Les grades et stades d'avancement du cancer sont représentés dans le tableau 3.1 :

Lignée cellulaire	Tissu ou tumeur d'origine	Stade et Grade	Provenance de la lignée
RT112	Urothélium vésical	Ta G2	TumorBank Deutsches
T24	Urothélium vésical	T2-3 G3	ATCC-HTB-4
J82	Urothélium vésical	T3 G3	ATCC-HTB-1

TABLE 3.1 – Stades et grades des trois lignées cellulaires utilisées dans notre étude : RT112, T24, J82.

Sonder les propriétés mécaniques et leur variation locale en fonction de l'invasivité permettra de mettre en évidence une signature de l'invasivité. De plus, les cellules cancéreuses se développent sur des environnements plus ou moins rigides, c'est pourquoi nous accordons de l'importance à l'influence de l'environnement dans notre étude.

3.2 Matériels et méthodes

3.2.1 Culture des cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses de la vessie, T24, à grand potentiel métastatique, sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 complété avec 10% de sérum fœtal de veau et 1% de pénicilline streptomycine. Toutes les cellules sont cultivées sur des lames de verre recouvertes de fibronectine (25 $\mu\text{g/mL}$) à 37°C à 5% de CO_2 . Les mesures sont effectuées après une nuit de culture sur cellules isolées afin d'éviter la contribution de l'influence des cellules avoisinantes. Les cellules ont été transfectées avec le plasmide LifeAct qui exprime l'actine-GFP (Green Fluorescent Protein - pEGFP). Il est ainsi possible de suivre l'évolution des fibres d'actine avec un microscope confocal.

3.2.2 Perturbation du réseau d'actine

Pour vérifier comment le cytosquelette d'actine influence les propriétés viscoélastiques, les cellules T24 ont été traitées avec trois drogues² aux actions différentes :

- LatrunculinA (0.1 μM) : inhibe la polymérisation des filaments d'actine en se liant au monomère de G-actine (Yarmola et al., 2000)

2. Sigma Aldrich

- Y27632 (20 μM) : inhibe le complexe Rho-kinase qui active la myosine-II importante pour la contractilité acto-myosine. Cette drogue induit une relaxation du cytosquelette (Narumiya et al., 2000). Il est connu que la famille Rho est constituée des médiateurs clés de la morphologie de la cellule (Ridley, 1996).
- Jasplakinolide (0.1 μM) : stabilise les filaments d'actine en stimulant la nucléation de sous-unités de monomères de G-actine. Cependant, il a été montré que selon la concentration initiale en G-actine et F-actine, la formation d'aggrégats de G-actine peut augmenter et induire une agglomération de monomères d'actine et la perturbation des filaments d'actine (Bubb et al., 2000)

Les concentrations indiquées de chaque drogue ont été choisies de façon à ce que la cellule ne se rétracte pas trop pour pouvoir continuer à faire des mesures à la périphérie de la cellule.

Les mesures sont faites avant et après le traitement avec drogue. Une fois que G' et G'' sont mesurés sans traitement, le milieu est retiré et le milieu contenant la drogue est rajouté à la concentration désirée. Ensuite une mesure à trois positions (noyau, périnoyau, périphérie) est effectuée toutes les 10 minutes pendant 40 minutes. Puis le milieu est rincé avec du milieu sans drogue et les mesures sont faites 20 minutes plus tard.

3.2.3 Microscopie confocale

La microscopie confocale est utilisée séparément pour déterminer la microstructure du cytosquelette d'actine avant et après traitement. Une image est effectuée toutes les 10 minutes après rajout de la drogue. Les piles d'images (Z-stack) ont été prises avec un Leica TCS SP8 en utilisant le laser Argon (488 nm) et un objectif à immersion 40x. Ce microscope est situé sur la plateforme microscopique du LIPhy.

La distribution d'actine en 3D est représentée à l'aide de projections en Z avec un code couleur correspondant à chaque hauteur, et est quantifiée grâce à l'analyse de l'intensité de fluorescence dans chaque région de la cellule à l'aide du logiciel ImageJ³. Le protocole détaillé est disponible en annexe B.

3.2.4 AFM en mode dynamique

Les mesures de G' et G'' sont effectuées suivant le protocole décrit dans le chapitre précédent à trois positions différentes sur la cellule : noyau (N), périnoyau (P) et lamellipode (E). Comme les cellules sont soumises à trois indentations toutes les 10 minutes, il est nécessaire de réduire le nombre de fréquences appliquées à chaque position. La gamme réduite $f = [1, 3, 10, 30, 100, 300 \text{ Hz}]$ est celle qui nous a permis d'appliquer des oscillations sans endommager les cellules. Nous utilisons une pointe pyramidale (MLCT, Levier C, $k = 0.01 \text{ N/m}$), et le module de cisaillement complexe

3. Rasband WS. 1997. ImageJ Bethesda, MD : U.S. National Institute of Health

est corrigé à la fois par la traînée hydrodynamique et aussi par l'effet du substrat (au lamellipode et périmoyau) comme expliqué au chapitre 2.

3.2.5 Modèle rhéologique simplifié

Un modèle rhéologique simplifié est utilisé pour décrire le comportement viscoélastique des cellules dans la gamme de fréquence $f = [1-300]$ Hz :

$$G'(\omega) = G_N^0 + k_1 \omega^a \quad (3.1)$$

$$G''(\omega) = k_0 \omega^{-n_f} + b k_1 \omega^a \quad (3.2)$$

où G_N^0 est le plateau élastique classique, $-n_f$ la pente de G'' aux petites fréquences dans la courbe log-log, a la pente de G' et G'' dans le régime de transition vitreuse, b décrit le rapport G''/G' aux hautes fréquences, et k_0 , k_1 sont des paramètres d'ajustement. La raison d'utilisation de ce modèle vient du fait que l'optimisation des paramètres est plus facile et plus rapide car les fonctions à optimiser sont simples (dérivées connues) par rapport au modèle intégral/fractionnaire du chapitre 2.

La Fig. 3.2 montre les modules G' et G'' d'un gel de polyacrylamide (concentration 10%) mesurés avec un rhéomètre classique ($f = [10^{-3} - 3]$ Hz) et par AFM en mode modulation de force ($f = [1 - 300]$ Hz). L'ajustement paramétrique des données avec le modèle simplifié Eqs.3.1-3.2 et les paramètres issus sont présentés dans la tableau 3.2. Ce modèle est en accord avec les résultats précédents.

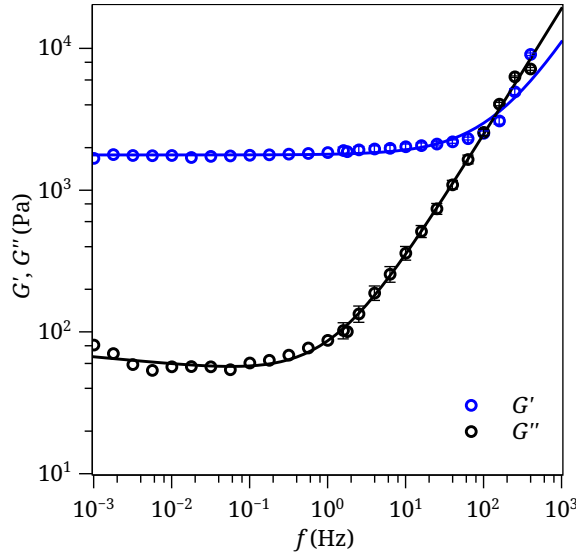


FIGURE 3.2 – Modèle rhéologique simplifié appliqué sur un gel de polyacrylamide (10% d'acrylamide) : les mesures expérimentales (rhéométriques et AFM) sont utilisées. La ligne est l'ajustement paramétrique avec le modèle simplifié (Eqs.3.1-3.2). Les paramètres sont représentés dans le tableau 3.2

Une fréquence de transition typique f_T correspondant à l'intersection entre G' et G'' peut être déduite. Au dessus de cette fréquence, G' et G'' augmentent avec

une pente similaire a . Cette fréquence est une signature du gel de polyacrylamide (comme démontré dans le chapitre 2 et dans notre article ([Abidine et al., 2015a](#))). Dans le domaine des hautes fréquences et avec $b > 1$ la relation $G' = G''$ s'écrit :

$$G_N^0 + k_1 \omega_T^a = b k_1 \omega_T^a \quad (3.3)$$

La fréquence de transition $f_T = \omega_T/2\pi$ est ainsi déduite :

$$f_T = \frac{1}{2\pi} \left(\frac{G_N^0}{(b-1)k_1} \right)^{1/a} \quad (3.4)$$

Ce modèle simplifié (3.1)–(3.2) peut décrire la rhéologie de gels et substrats mous et sera utilisé pour décrire le comportement viscoélastique des cellules.

G_N^0 (Pa)	n_f	k_0	k_1	a	b	f_T (Hz)
1773	0.05	51	3.8	0.89	2.0	158

TABLE 3.2 – Paramètres issus du modèle simplifié sur gel de polyacrylamide 10%

3.3 Influence du cytosquelette sur les propriétés viscoélastiques

3.3.1 Hétérogénéité des propriétés viscoélastiques de cellules cancéreuses T24

Au noyau, les modules G' et G'' sont mesurés grâce à la méthode décrite au chapitre 2 et tracés en fonction de la fréquence en échelle log-log (Fig. 3.3).

Le module complexe de cisaillement suit la dépendance en fréquence typique trouvée dans d'autres types cellulaires comme les neutrophiles, les cellules musculaires et d'autre types de cellules cancéreuses en utilisant différentes méthodes microrhéologiques ([Smith et al., 2005](#); [Fabry et al., 2001](#)). G' présente un plateau aux faibles fréquences jusqu'à 20 Hz puis augmente avec la fréquence en suivant une loi de puissance avec l'exposant $a \simeq 0.8$. Le module visqueux G'' est plus petit que le module élastique G' dans le régime des faibles fréquences et augmente avec la fréquence jusqu'à ce que G'' domine dans le domaine des hautes fréquences.

Quelques études ont tenté d'expliquer le comportement en loi de puissance du spectre microrhéologique des cellules vivantes ([Alcaraz et al., 2003](#)). En décrivant la cellule comme un matériau vitreux mou ([Sollich, 1998](#)), des caractéristiques rhéologiques peuvent être attribuées à l'organisation et au remodelage du cytosquelette. Des chercheurs ([Rother et al., 2014](#); [Alcaraz et al., 2003](#)) ont utilisé ce modèle pour expliquer les propriétés viscoélastiques de cellules cancéreuses du poumon. Un paramètre commun est la pente ($a \sim 0.2$) de G' et G'' , aux faibles fréquences, et la pente de 1 pour G'' aux plus grandes fréquences, ce qui est attribué à une composante

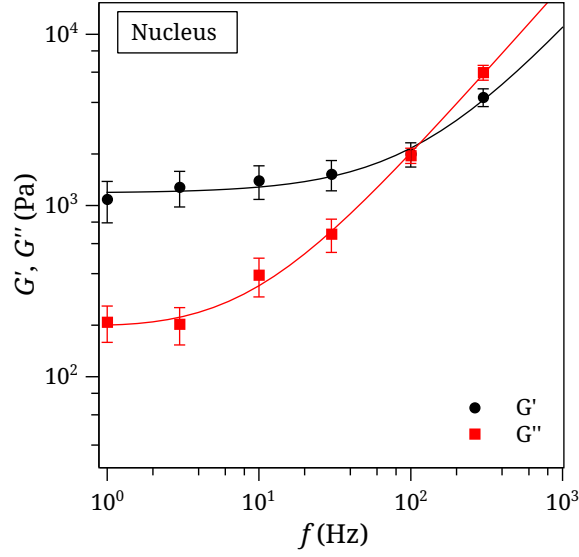


FIGURE 3.3 – Evolution des modules G' et G'' dans la région au-dessus du noyau de cellules T24 isolées ($N = 20$). Des paramètres sont déduits de l'ajustement des courbes avec le modèle (Eqs.3.1–3.2).

visqueuse. Dans notre cas, il y a un plateau pour G' aux petites fréquences et la pente 'a' est proche de 1. Le fait d'obtenir ce plateau est nouveau.

Les propriétés viscoélastiques des cellules ont été mesurées localement, et sont différentes d'une région de la cellule à l'autre, comme indiqué sur la Fig. 3.4 où sont représentés G' et G'' mesurés au dessus du noyau, périnoyau et lamellipode. Les modules sont corrigés par l'effet du substrat à cause des hauteurs faibles au niveau du périnoyau et périphérie (la méthode de mesure de la hauteur est décrite en annexe A).

Des tendances similaires sont observées aux trois positions mais les modules augmentent en allant du noyau à la périphérie (N à P à E). Nous décrivons ces données avec le modèle simplifié Eqs.3.1–3.2. et les paramètres essentiels issus de l'ajustement (G_N^0 , a et b) sont représentés en Fig. 3.5.

La projection en Z de la distribution d'actine (Fig. 3.4), issue de la microscopie confocale, montre que la distribution d'actine n'est pas homogène. Chaque plan est représenté par une couleur et qualitativement il est possible d'observer cette hétérogénéité. L'intensité moyenne de fluorescence de l'actine a été analysée dans les trois régions de la cellule et représentée en Fig. 3.5. On peut observer que l'intensité devient plus importante à la périphérie. Ce résultat est en accord avec d'autres études qui montrent que la périphérie de la cellule est riche en filaments d'actine (Bao and Suresh, 2003). En effet, la cellule adhérente forme des fibres de stress F-actine pour pouvoir effectuer ses fonctions biologiques.

Si l'on compare l'intensité de fluorescence aux propriétés mécaniques sondées aux trois positions différentes (Fig. 3.4 et Fig. 3.5), des points intéressants ressortent. Tout d'abord la viscoélasticité des cellules cancéreuses dépend de la position et G^*

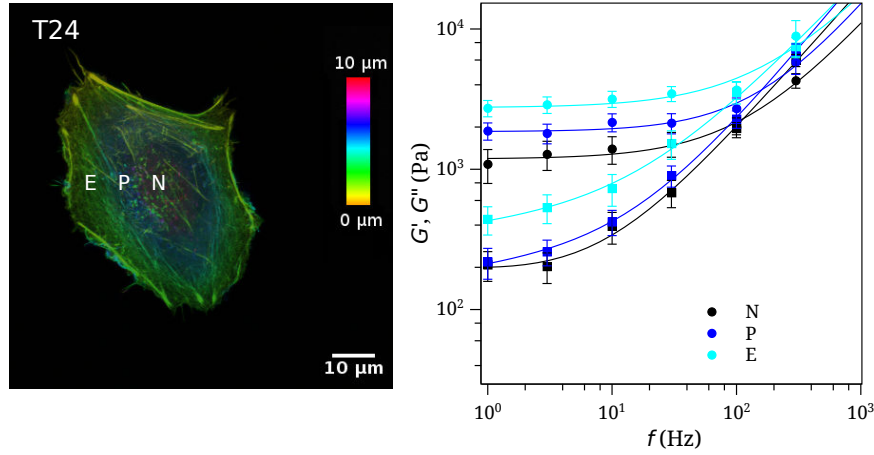


FIGURE 3.4 – Gauche : Images confocales d'une cellule T24. Une projection en z avec une échelle de couleur correspondant à la hauteur est faite (jaune est le plan basal, rose le plan apical de la cellule). Les indentations sont faites à trois positions différentes : noyau (N), périnoyau (P) et périphérie (E). Droite : Evolution des modules G' (rond) et G'' (carré) sur le noyau (noir), périnoyau (bleu) et à la périphérie (cyan); $N = 20$. Les courbes sont ajustées avec le modèle simplifié.

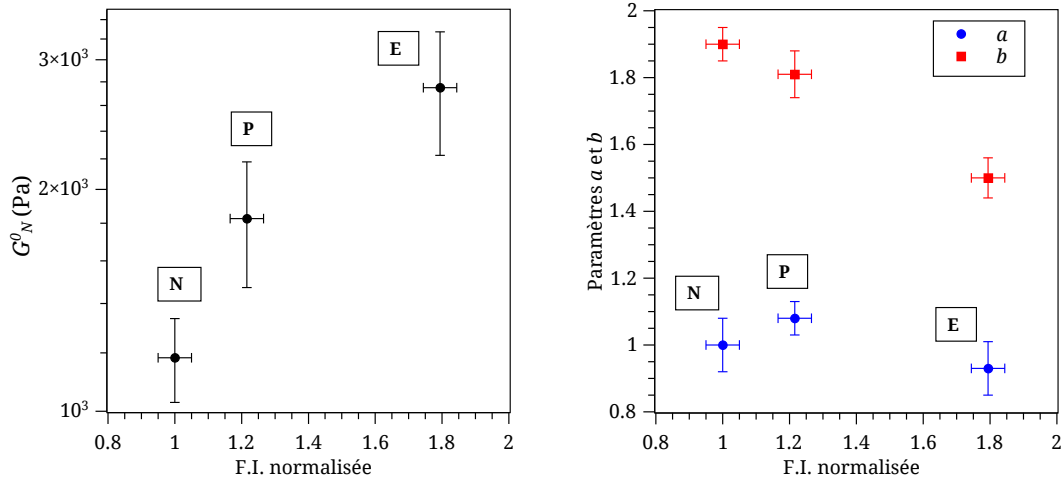


FIGURE 3.5 – Les paramètres G_N^0 , a et b en fonction de l'intensité de fluorescence. L'intensité a été normalisée par la valeur au noyau pour mieux rendre compte de l'évolution. Les paramètres sont déduits de mesures aux trois positions des cellules T24 : noyau (N), périnoyau (P) et périphérie (E); $N = 20$.

montre la même tendance aux trois positions. Cependant, le plateau élastique augmente en allant du noyau au lamellipode, alors que le module visqueux augmente avec la fréquence et devient dominant aux hautes fréquences. Nous observons que l'écart entre G' et G'' devient plus important au niveau de la périphérie, ce qui suggère l'importance de l'élasticité liée à la présence des fibres d'actine. Le paramètre b (qui est le rapport G''/G' aux hautes fréquences) diminue en allant vers la périphérie, ce qui confirme encore une fois que la rigidité à la périphérie augmente. Le paramètre

G_N^0 augmente avec l'intensité de fluorescence ce qui confirme que la rigidité de la cellule dépend de la microstructure de l'actine. La pente a est relativement constante à travers la cellule suggérant que l'organisation de la structure de l'actine n'est pas d'importance majeure dans la transition vitreuse.

L'hétérogénéité spatiale des propriétés viscoélastiques de cellules normales a été observée par [Cai et al. \(2013\)](#). Ils ont mesuré G' et G'' à deux positions différentes dans le cas de fibroblastes (au centre et loin du centre) et, contrairement à nos observations, ils ont trouvé que le centre de la cellule est plus rigide. De même, [Rigato et al. \(2015\)](#) ont aussi noté que le centre de la cellule a un module d'Young plus grand que la périphérie. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les cellules qu'ils mesurent sont confinées. En effet, les cellules sont cultivées sur des motifs d'adhésion, ce qui les empêche de former des fibres de stress⁴ à la périphérie. Ces résultats sont donc dans un environnement adhésif différent.

Dans notre cas, nous trouvons que le lamellipode est plus rigide que le reste de la cellule et que la composante visqueuse contribue moins aux propriétés locales. Ce comportement a été aussi observé par [Rebelo et al. \(2013\)](#) qui ont sondé le module d'Young à trois positions différentes sur des cellules normales et cancéreuses : le centre de la cellule, la région intermédiaire et la périphérie. De même que pour nos résultats, ils observent des différences de réponses entre le centre de la cellule et la périphérie : cette dernière a un module d'Young plus grand que celui du centre. Ils expliquent ce comportement par une comparaison de la structure et morphologie de la périphérie de chaque lignée cellulaire (cependant ils ne font pas de quantification de l'intensité de fluorescence comme dans notre étude).

Nous avons donc mis en évidence un lien entre la microstructure de l'actine et les propriétés mécaniques G' et G'' , et la perturbation de ce réseau d'actine nous permettra de mieux caractériser ce lien.

3.3.2 Influence de l'actine sur les propriétés mécaniques

Les propriétés viscoélastiques des cellules mesurées par AFM sont associées au réseau d'actine, qui est spatialement hétérogène et varie avec le temps. Perturber le réseau d'actine et en déduire des paramètres d'ajustement nous permettra une meilleure compréhension du lien entre la microstructure d'actine et la microrhéologie des cellules.

Trois drogues sont utilisées pour effectuer cette perturbation : la LatrunculinA, qui inhibe la polymérisation de l'actine, la Y27632, qui inhibe la contractilité actomyosine et la Jasplakinolide, qui stabilise le réseau d'actine.

3.3.2.1 Variation de l'intensité de fluorescence

Des projections en z , avec une échelle de couleur, de cellules T24 avant et après traitement avec les trois drogues, sont représentées en Fig. 3.6.

4. "bundles"

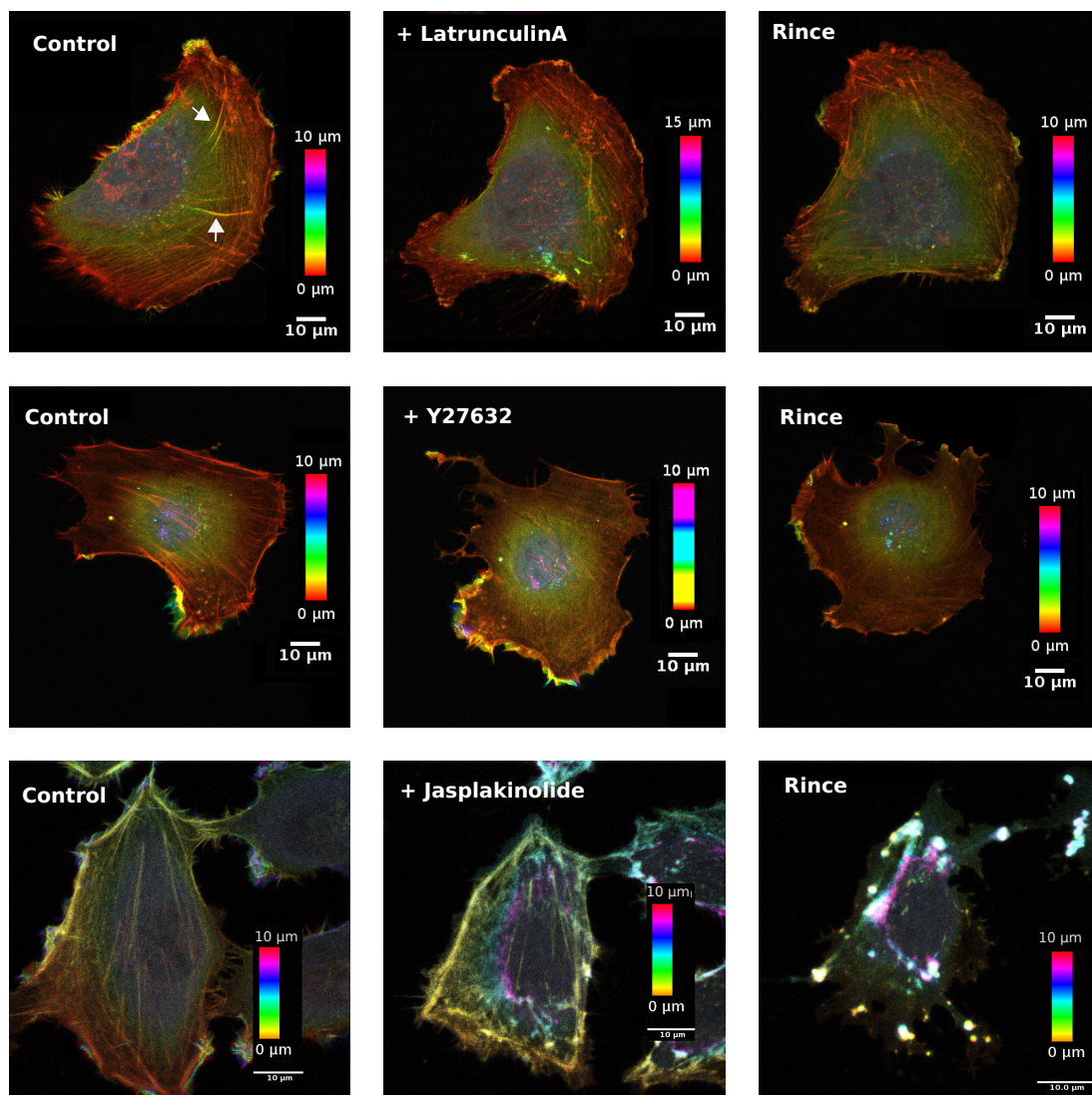


FIGURE 3.6 – Projection en z avec un échelle de couleur de cellules T24 contrôle, en présence de drogues à $t=20$ min et 20 min après rinçage. Les flèches blanches indiquent les filaments transversaux qui vont du plan basal jusqu'au noyau.

La LatrunculinA et la drogue Y27632 semblent avoir l'effet attendu : en présence de LatrunculinA, les fibres d'actine rétrécissent et les fibres transversales disparaissent, alors que en présence de Y27632, les fibres ne semblent pas rétrécir mais la cellule change de morphologie. En ce qui concerne la Jasplakinolide, le résultat attendu à cette concentration relativement faible et les observations ne sont pas similaires : des agrégats se forment et la cellule rétrécit.

La distribution d'actine avant et après traitement est quantifiée par l'intensité de fluorescence normalisée par la valeur d'intensité initiale à chaque position (Fig. 3.7). Bien noter que seule l'évolution dans le temps à chaque position est représentée

(ainsi comparer la valeur au noyau et au périnoyau à un instant donné n'est pas possible ici) :

- La LatrunculinA a pour effet de diminuer l'intensité de fluorescence au niveau du noyau et de la périphérie (en noir et bleu en Fig. 3.7), alors qu'autour du noyau, il ne semble pas y avoir d'effet particulier. Après rinçage du milieu, l'intensité augmente et se rapproche des valeurs initiales, ce qui peut être expliqué par la polymérisation de fibres d'actine.
- Y27632 a pour effet de diminuer l'intensité au niveau du périnoyau et de la périphérie, qui ne revient pas aux valeurs initiales après rinçage. Au niveau du noyau, l'ajout de drogues semble augmenter légèrement l'intensité.
- La Jasplakinolide est supposée stabiliser la structure or cette drogue semble avoir le même effet que la Y27632. Les images confocales montrent l'apparition d'agrégats de monomères G-actine.

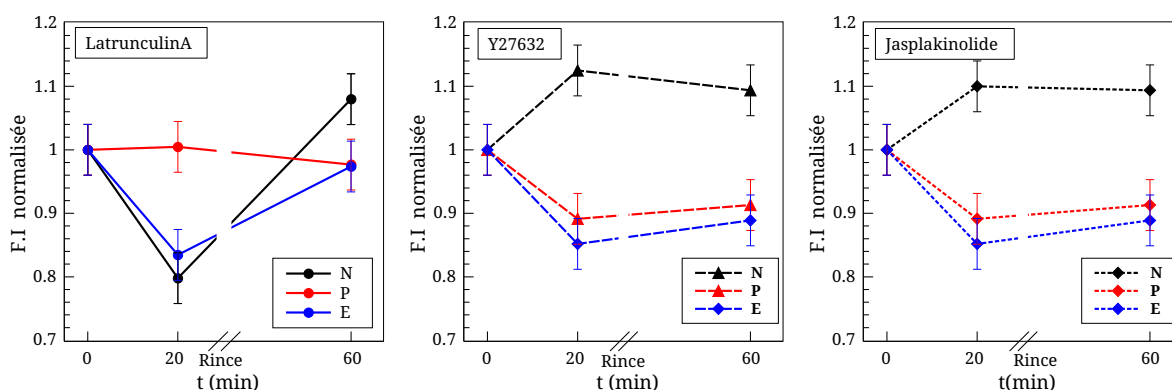


FIGURE 3.7 – Evolution de l'intensité de fluorescence (F.I) normalisée en présence de drogues en fonction du temps aux trois positions : noyau N (noir), périnoyau P (rouge) et périphérie E (bleu). L'évolution est mesurée pour trois drogues : LatrunculinA 0.1 μ M (cercle, ligne pleine), Y27632 20 μ M (triangle, tiret) et Jasplakinolide 0.1 μ M (losange, pointillé). A $t=0$ le milieu est sans drogue, à $t=20$ la drogue est rajoutée, et à $t=60$ min, la drogue est rincée. Afin de mieux comprendre l'évolution de l'intensité en fonction du temps, les valeurs sont normalisées par la valeur de FI à $t=0$ pour chaque position respective.

3.3.2.2 Inhibition de la polymérisation de l'actine (LatrunculinA)

La Fig. 3.8 montre les propriétés mécaniques de cellules T24 avant et après traitement avec la LatrunculinA (0.1 μ M) à trois positions différentes. Les mesures ont été effectuées avant ($t = 0$) et après traitement ($t = 20$ min et 30 min). Les images confocales (Fig.3.6) montrent que les filaments d'actine ont bien été perturbés (par exemple, les fibres transversales traversant la cellule du plan basal au plan apical ne sont plus présentes après traitement). Cependant, du fait de notre faible concentration de LatrunculinA (pour éviter que la cellule ne se rétracte), des fibres d'actine sont toujours présentes au plan basal.

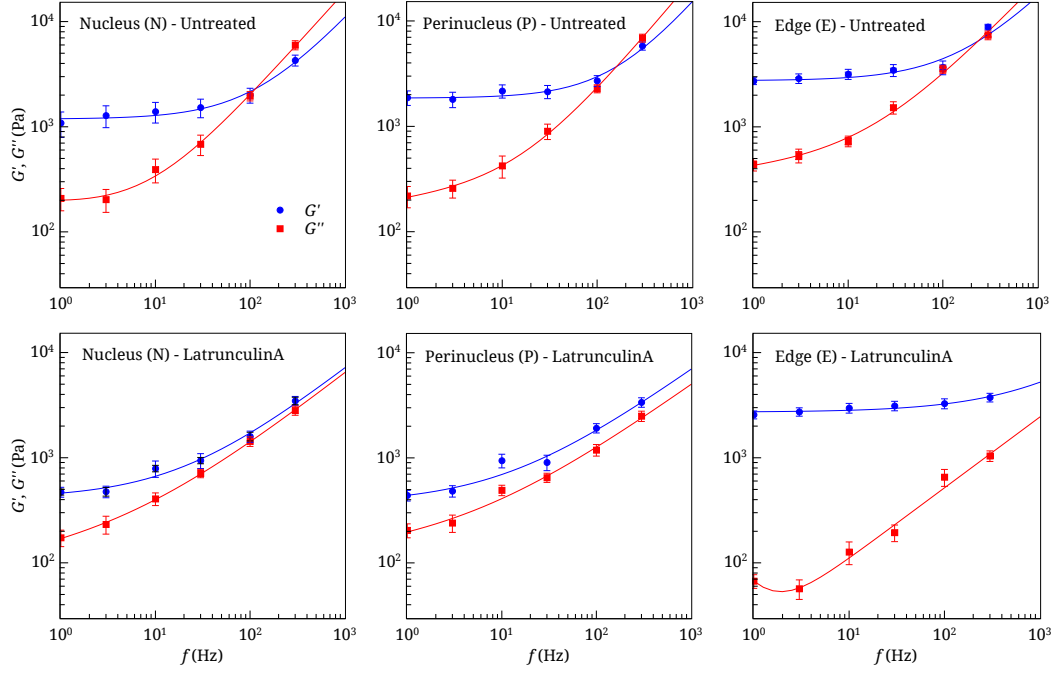


FIGURE 3.8 – Evolution des modules G' (cercles bleus) et G'' (carré rouge) sur le noyau, périnoyau et périphérie de cellules T24 non traitées (haut) et 20 min après rajout de LatrunculinA (bas) de concentration 0.1 μ M ; $N = 20$ et les barres d'erreur sont les erreurs types de la moyenne (SEM). Les courbes sont ajustées avec le modèle simplifié (Eqs. 3.1)–(3.2). Les paramètres sont résumés dans la table 3.3.

Le plateau élastique G_N^0 et l'intensité de fluorescence correspondante sont représentés en Fig. 3.9. Les paramètres issus de l'ajustement des données avec le modèle Eqs. 3.1–3.2 sont résumés dans la Table. 3.3. On note que les modules G' et G'' augmentent avec la fréquence même après inhibition de la polymérisation de l'actine (Fig. 3.8). Ces résultats sont cohérents avec ceux observés dans des études précédentes (Citters et al., 2006; Cai et al., 2013; Hiratsuka et al., 2009). Après inhibition, les modules G' et G'' ne se croisent plus, le réseau reste donc élastique aux hautes fréquences. Le plateau élastique G_N^0 décroît au centre de la cellule et au périnoyau. Cependant, à la périphérie de la cellule, G_N^0 reste constant bien que l'intensité de fluorescence diminue (Fig. 3.9). Ceci peut être dû au fait que la concentration de LatrunculinA est faible dans notre cas (0.1 μ M). Ainsi, même s'il y a diminution de l'intensité de fluorescence, la présence des fibres d'actine maintient les propriétés élastiques. On remarque que G'' diminue considérablement au niveau de la périphérie et le milieu devient très élastique.

Ces résultats suggèrent que la mécanique de la périphérie ne dépend pas uniquement de la distribution du cytosquelette d'actine.

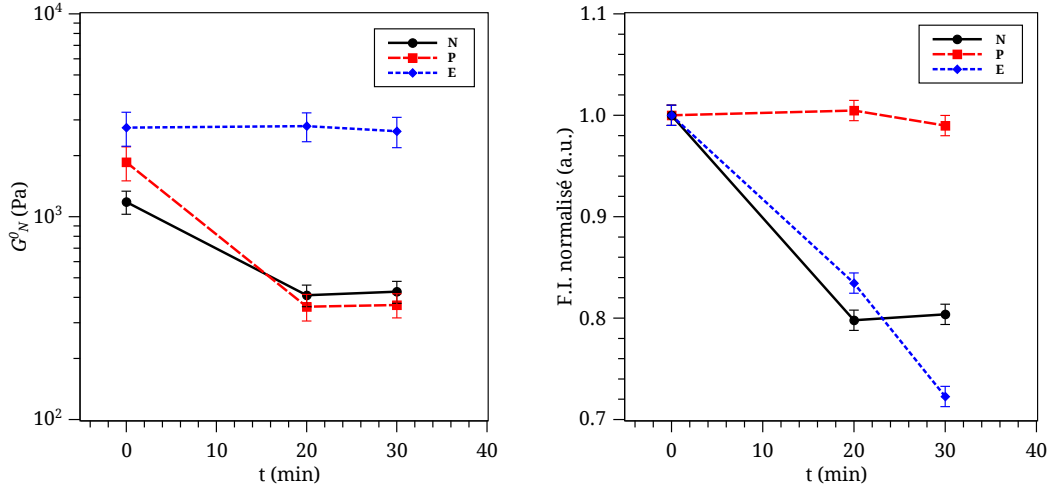


FIGURE 3.9 – G_N^0 (gauche) et intensité de fluorescence d'actine (droite) normalisée par la valeur à $t=0$. Ces deux paramètres sont représentés à $t = 0$ et à $t = 20$ min et $t = 30$ min après rajout de Latrunculin A $0.1 \mu\text{M}$.

Position	Paramètres	$t = 0$	$t = 20\text{min}$
Noyau (N)	F.I. normalisée	1 ± 0.01	0.79 ± 0.01
	$G_N^0(\text{Pa})$	1182 ± 154	410 ± 50
	n_f	0.08 ± 0.008	-0.12 ± 0.008
	a	1.00 ± 0.03	0.71 ± 0.02
	b	1.90 ± 0.08	0.91 ± 0.05
Périnoyau (P)	F.I. normalisée	1 ± 0.01	1 ± 0.01
	$G_N^0(\text{Pa})$	1856 ± 354	360 ± 54
	n_f	-0.113 ± 0.007	-0.07 ± 0.001
	a	1.08 ± 0.02	0.65 ± 0.02
	b	1.80 ± 0.08	0.71 ± 0.05
Périphérie (E)	F.I. normalisée	1 ± 0.01	0.83 ± 0.01
	$G_N^0(\text{Pa})$	2749 ± 524	2796 ± 454
	n_f	-0.09 ± 0.008	0.29 ± 0.008
	a	0.93 ± 0.04	0.67 ± 0.04
	b	1.50 ± 0.08	0.97 ± 0.05

TABLE 3.3 – L'intensité de fluorescence (FI) normalisée et les paramètres d'ajustement G_N^0 , n_f , a et b déduits du modèle(3.1)–(3.2) pour des cellules T24 traitées à la Latrunculin A ($0.1 \mu\text{M}$). Ici, seuls les temps $t = 0$ et $t = 20$ min sont représentés; $N = 20$. L'intensité de fluorescence est normalisée par la valeur à $t=0$ afin de mieux représenter l'évolution.

3.3.2.3 Inhibition de la contractilité acto-myosine (Y27632)

Des études plus poussées ont été effectuées en inhibant la contractilité acto-myosine avec la drogue Y27632.

Au niveau du noyau et après inhibition de la contractilité acto-myosine, les modules G' et G'' se croisent à une fréquence f_T plus petite (Fig. 3.10, au noyau), ce

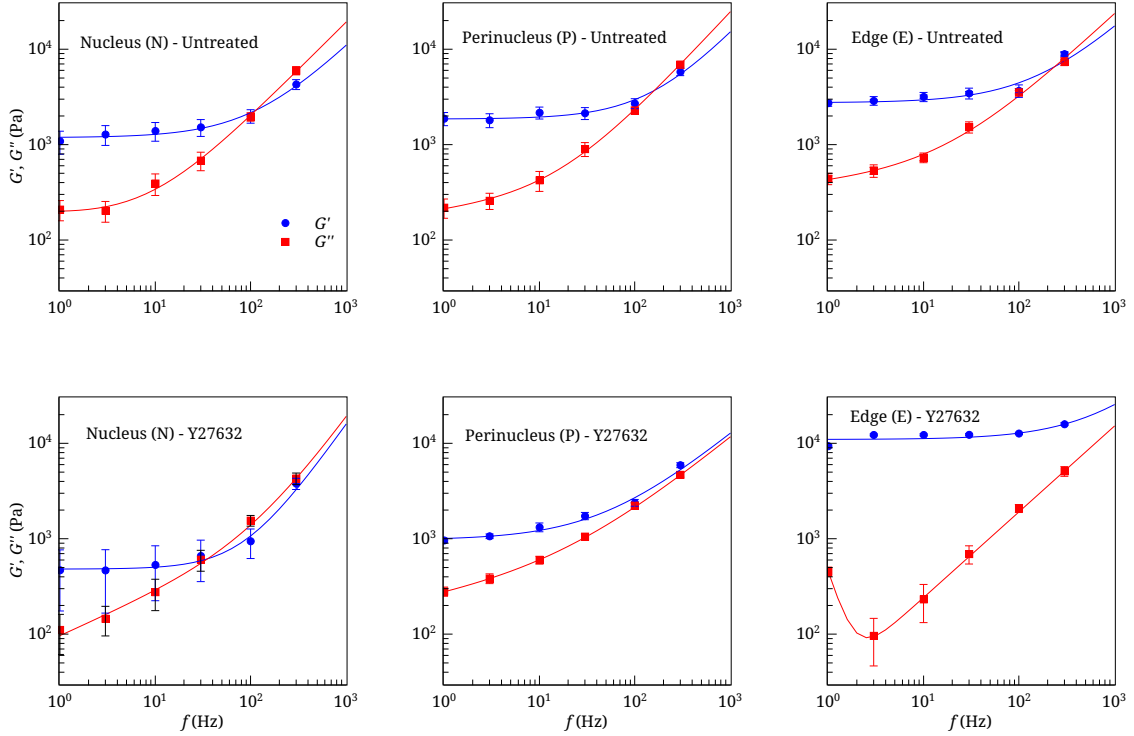


FIGURE 3.10 — Evolution des modules G' (cercles bleus) et G'' (carré rouge) sur le noyau, périnoyau et périphérie de cellule T24 non traitées (haut) et 20 min après rajout de Y27632 (bas) de concentration 20 μ M ; $N = 20$ et les barres d'erreur sont les erreurs types de la moyenne (SEM). Les courbes sont ajustées avec le modèle simplifié (Eqs. 3.1)–(3.2). Les paramètres sont résumés dans la table 3.4

qui n'est pas le cas pour le reste de la cellule. Ceci peut être corrélé à la mesure d'intensité de fluorescence obtenue. Cette intensité montre que la distribution d'actine ne varie pas considérablement, mais il y a une différence entre le noyau et la région extérieure. Ceci suggère que l'augmentation d'actine monomérique au niveau du noyau donne un comportement plus liquide au système.

Des remarques intéressantes peuvent être mentionnées à propos des propriétés de la périphérie de la cellule, en particulier G_N^0 qui augmente (Table 3.4) et G'' diminue considérablement après traitement. La périphérie devient plus élastique après inhibition par Y27632. Ce résultat peut être surprenant, mais il peut s'expliquer par le fait que la réorganisation de l'actine est régulée par la famille Rho (petites GTPases) dont Cdc42, Rac et Rho qui sont des régulateurs clés de l'assemblage de l'actine (Raftopoulou and Hall, 2004). Ainsi il y a d'autres protéines qui peuvent réorganiser le cytosquelette. Une autre piste est que Y27632 empêche le complexe acto-myosine de se contracter et il n'y a plus de tension dans les fibres acto-myosines qui relient le plan basal au sommet de la cellule. Ainsi ces fibres vont se délier et se retrouver au plan basal, ce qui induit l'augmentation de l'élasticité en périphérie. Récemment, Labouesse et al. (2015) ont suggéré qu'il existe des forces indépendantes de la myo-

Position	Paramètres	$t = 0$	$t = 20 \text{ min}$
Noyau (N)	F.I. normalisée	1 ± 0.01	1.125 ± 0.01
	$G_N^0(\text{Pa})$	1182 ± 154	480 ± 31
	n_f	0.08 ± 0.008	-0.44 ± 0.0068
	a	1.00 ± 0.03	1.41 ± 0.02
	b	1.90 ± 0.08	1.1 ± 0.01
Périnoyau (P)	F.I. normalisée	1 ± 0.01	0.89 ± 0.01
	$G_N^0(\text{Pa})$	1856 ± 354	970 ± 200
	n_f	-0.113 ± 0.007	-0.18 ± 0.001
	a	1.08 ± 0.02	0.83 ± 0.05
	b	1.80 ± 0.08	0.91 ± 0.02
Périphérie (E)	F.I. normalisée	1 ± 0.01	0.85 ± 0.01
	$G_N^0(\text{Pa})$	2749 ± 524	8563 ± 500
	n_f	-0.09 ± 0.008	2.3 ± 0.008
	a	0.93 ± 0.04	0.89 ± 0.04
	b	1.50 ± 0.08	0.85 ± 0.02

TABLE 3.4 – L'intensité de fluorescence (FI) normalisée et les paramètres d'ajustement G_N^0 , n_f , a et b déduits du modèle(3.1)–(3.2) pour des cellules T24 traitées avec Y27632 (20 μM) ; $N = 20$ et les barres d'erreur sont les SEM.

sine qui seraient reliées à une composante élastique passive à la périphérie de la cellule, ce qui contribue à une tension additionnelle présente même après l'inhibition avec Y27632. Ces résultats peuvent être reliés à nos observations en périphérie puisque l'inhibition de la contractilité acto-myosine a précisément augmenté l'élasticité.

3.3.2.4 Stabilisation du réseau d'actine (Jasplakinolide)

Après avoir inhibé les fonctions de l'actine et l'acto-myosine, nous cherchons à stabiliser la structure. Dans la littérature, la Jasplakinolide est supposée stimuler la nucléation des filaments d'actine. Or, dans notre cas, même avec une concentration très faible, on remarque la perturbation des fibres et l'apparition d'agglomérats de monomères d'actine-G (Fig. 3.6).

Des mesures de modules de cisaillement ont aussi été effectuées à trois positions différentes toutes les 10 minutes après rajout de la drogue (la Fig.3.11 montre seulement les courbes à $t=0$ et $t=20 \text{ min}$).

Les modules G' et G'' diminuent (sauf au niveau de la périphérie) mais surtout, ces modules ne se croisent plus, ce qui est plutôt un comportement observé lorsque l'actine est perturbée, comme le montre les résultats avec inhibition de la polymérisation de l'actine et la contractilité acto-myosine. Ce comportement peut être expliqué par le fait que des agrégats de monomères d'actine se forment et par conséquent le milieu adopte un comportement plus liquide.

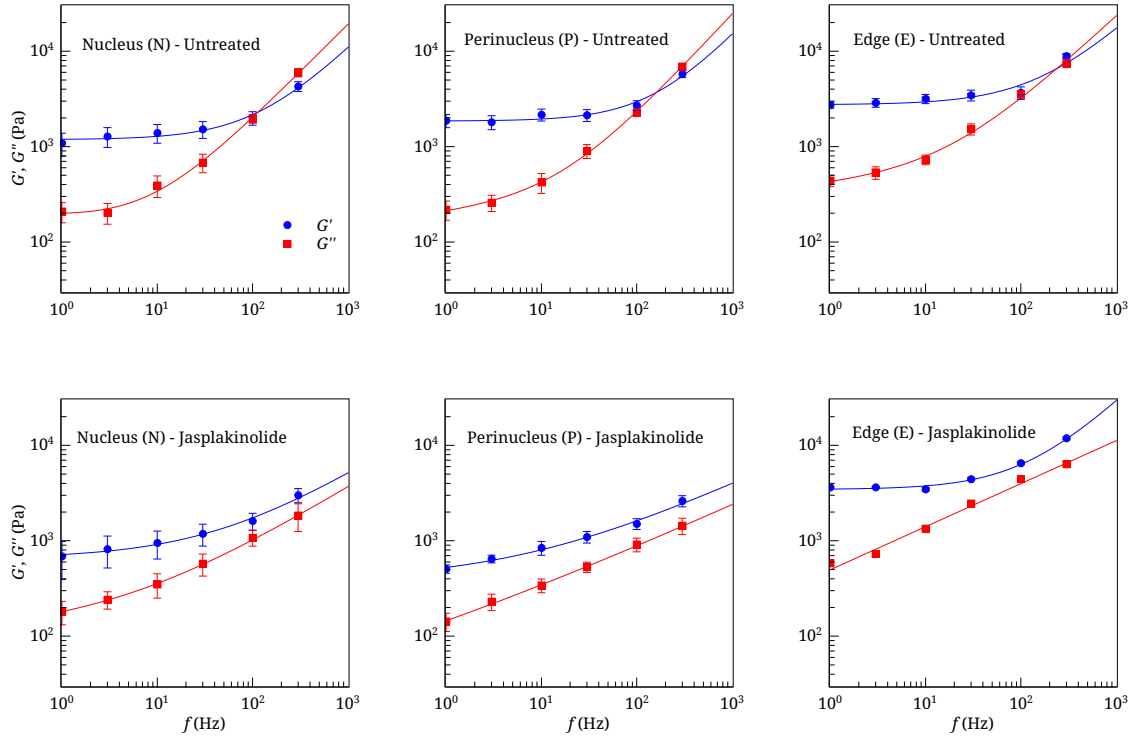


FIGURE 3.11 – Evolution des modules G' (cercle bleu) et G'' (carré rouge) sur le noyau, périnoyau et périphérie de cellule T24 non traitées (haut) et 20 min après rajout de Jasplakinolide (bas) de concentration 0.1 μ M ; $N = 20$ et les barres d'erreur sont les erreurs types de la moyenne (SEM). Les courbes sont ajustées avec le modèle simplifié (Eqs. 3.1)–(3.2).

La domination de l'actine dans la détermination de la rigidité de la cellule est montrée par une étude récente pour quantifier la rigidité avec des petites indentations plus petites que 200 nm sur la surface de cellules endothéliales par AFM (Costa et al., 2006). Ces études ont montré que des populations hétérogènes de valeurs de rigidité locales sont séparées en deux groupes avec des modules élastiques E de 5.6 ± 3.5 kPa et 1.5 ± 0.76 kPa en fonction de la présence ou non de fibres de stress sous la pointe AFM. Le rajout de cytochalasine D pour désassembler le réseau d'actine réduit la rigidité à 0.89 ± 0.46 kPa et le réseau devient plus homogène.

L'influence directe du réseau d'actine sur les propriétés mécaniques a été mis en évidence par plusieurs études (Citters et al., 2006; Cai et al., 2013; Lu et al., 2008), cependant nos résultats associant la microstructure de l'actine et les propriétés viscoélastiques montrent que les propriétés à la périphérie sont particulières.

Dans notre cas, nous avons mis en évidence des paramètres intéressants qui décrivent le comportement viscoélastique des cellules. Ce modèle a permis de lier le cytosquelette d'actine aux propriétés mécaniques. A présent, il s'agit de comparer les propriétés viscoélastiques de cellules cancéreuses d'invasivités différentes.

3.4 Influence de l'invasivité sur les propriétés viscoélastiques

Le lien entre la microstructure du réseau d'actine et les propriétés mécaniques a été mis en évidence. Nous avons observé une diminution des modules G' et G'' lorsque le cytosquelette d'actine n'est plus structuré en fibres dynamiques et lorsque la cellule n'est plus sous tension, et les modules ne se croisent plus.

Il a été montré que les propriétés mécaniques des cellules cancéreuses peuvent être une signature de leur potentiel métastatique (Rother et al., 2014). Cependant dans cette étude, le lien entre l'invasivité, les propriétés mécaniques et la microstructure du cytosquelette d'actine n'a pas été mis en évidence. C'est ce que nous cherchons à faire ici en accordant une attention particulière aux propriétés de la périphérie.

Trois lignées cancéreuses du carcinome de la vessie sont étudiées : RT112, T24 et J82, avec RT112 étant la lignée la moins invasive et J82 la plus invasive (Champelovier et al., 2003).

3.4.1 Le rôle de l'actine sur l'invasivité

Des images confocales de RT112, T24 et J82 sur verre ont été effectuées par microscopie confocale (Fig. 3.12). Une projection en z avec une échelle de couleur correspondant à la hauteur permet de comparer la distribution d'actine qualitativement. Une analyse quantitative de l'intensité de fluorescence permet de comparer l'évolution de la distribution d'actine à travers la cellule (Fig. 3.13 droite) et la normalisation de cette intensité par la valeur au noyau permet de comparer les lignées cellulaires entre elles (Fig. 3.13 gauche).

Les projections en z des images confocales des trois lignées cellulaires montrent que la morphologie de RT112 et T24 est très différente de celle de J82. Cette dernière est étirée avec des fibres de stress très longues au plan basal. Cette différence de morphologie et de structure du cytosquelette d'actine peut expliquer l'écart entre l'intensité de fluorescence analysée à partir de ces images (Fig. 3.13 droite). L'intensité de fluorescence des J82 sur toute la cellule est plus grande d'un rapport environ 5. Alors que la cellule T24, d'invasivité avoisinante de celle de J82, semble avoir une distribution plus proche de RT112.

Néanmoins, en normalisant l'intensité de chaque lignée aux trois positions (FI_N , FI_P , FI_E) par la valeur au noyau (FI_N) respectivement, l'évolution de la distribution d'actine à travers la cellule est mise en évidence (Fig. 3.13 droite), et il ressort que les cellules T24 et J82 ont un rapport d'intensité entre le noyau et le périnoyau ($\frac{FI_P}{FI_N} \sim 1.22 \pm 0.05$) équivalent. Ce qui n'est pas le cas pour $\frac{FI_E}{FI_N}$ à la périphérie. La RT112 semble avoir une distribution qui ne varie pas considérablement à travers la cellule (voir ligne "FI normalisée" dans la Table. 3.5).

Ainsi, il est possible de relier le potentiel métastatique à la microstructure à travers la cellule :

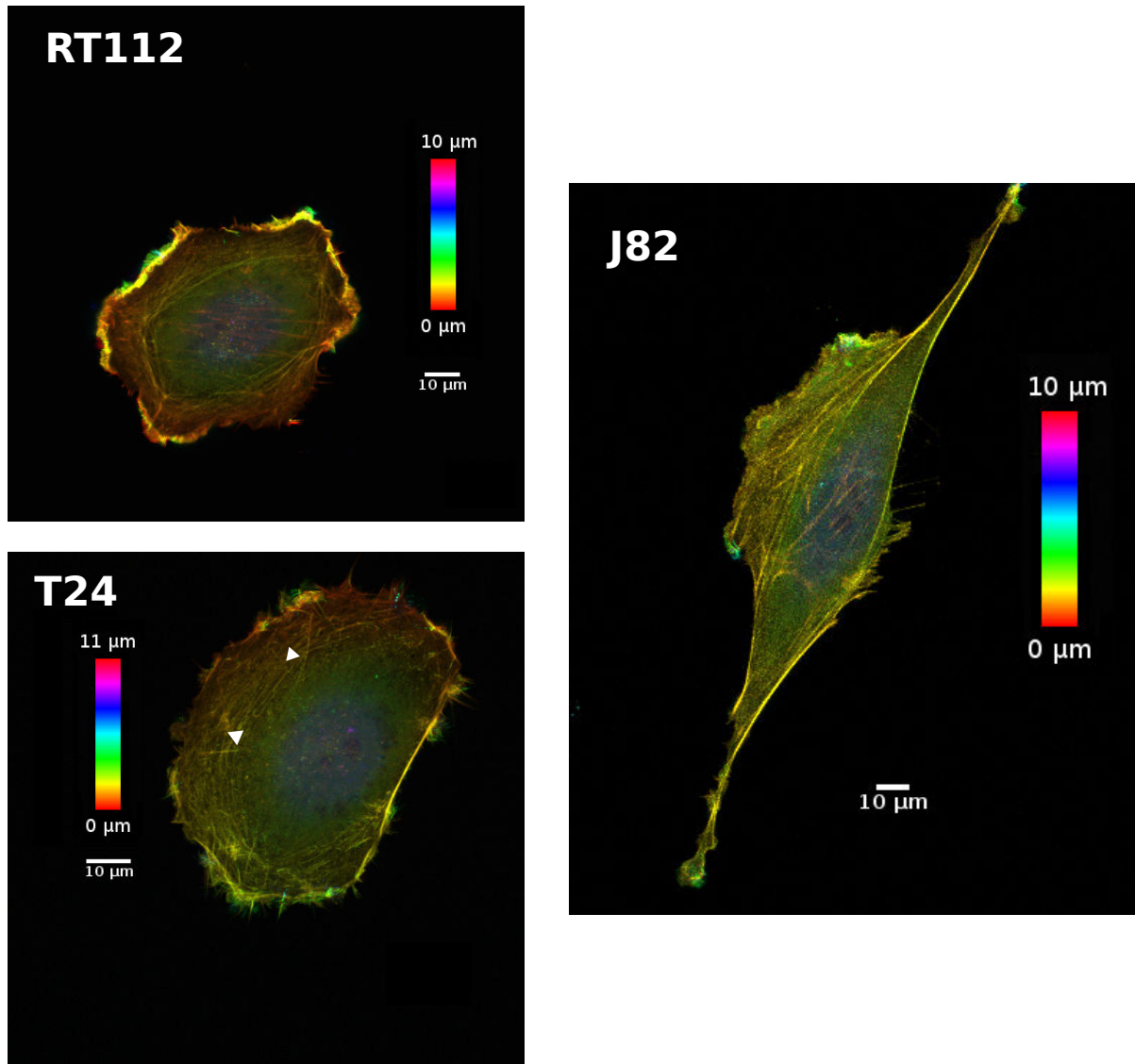


FIGURE 3.12 – Images confocales de trois lignées cellulaires sur verre : RT112, T24 et J82. Une projection en z avec une échelle de couleur a été faite. Les flèches blanches montrent les fibres transversales présentes dans les T24.

- Au centre (noyau et périnoyau) : le rapport d'intensité d'actine entre le noyau et le périnoyau ($\frac{FI_P}{FI_N}$) est plus grand pour les cellules les plus invasives $\frac{FI_P}{FI_N}(\text{invasive}) > \frac{FI_P}{FI_N}(\text{non invasive})$. Ceci suggère que plus une cellule a de l'actine autour du noyau (par rapport au noyau), plus elle sera invasive.
- A la périphérie : le rapport d'intensité entre la périphérie et le noyau est aussi un reflet de l'invasivité $\frac{FI_E}{FI_N}(J82) > \frac{FI_E}{FI_N}(T24) > \frac{FI_E}{FI_N}(RT112)$. Plus ce rapport est grand, plus la cellule est invasive. La distribution d'actine à la périphérie de la cellule est donc une caractéristique de l'invasivité.

Il sera intéressant par la suite d'observer comment ces tendances seront modifiées ou pas selon l'environnement (nous sommes ici sur verre).

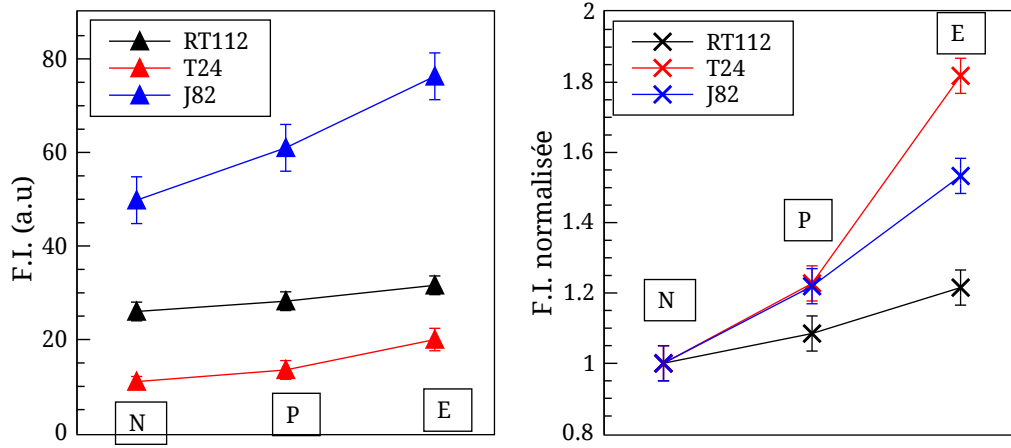


FIGURE 3.13 – Intensité de fluorescence des trois lignées cellulaires : RT112 (noir), T24 (rouge) et J82 (bleu), aux trois positions différentes : noyau N, périnoyau P et périphérie E. Gauche : l'intensité d'actine de chaque lignée. Droite : L'intensité est normalisée par la valeur au noyau.

Ces résultats montrent que la périphérie peut être une signature du potentiel métastatique. Il est maintenant intéressant de relier ces observations aux propriétés mécaniques, surtout la périphérie.

3.4.2 Les propriétés mécaniques et l'invasivité

La Fig. 3.14 montre les courbes $G'-G''$ des trois lignées cellulaires aux trois positions différentes : noyau, périnoyau et périphérie. Les mesures sont effectuées sur du verre recouvert de fibronectine (25 μ g/ml).

En Fig. 3.14, le module élastique de cisaillement G' diminue quand l'invasivité augmente. Les paramètres d'ajustement du modèle G_N^0 , a , b , la fréquence de transition f_T sont représentés en fonction de la position en Fig. 3.15, et le reste des paramètres est résumé dans la Table 3.5. Pour toutes les lignées, G_N^0 suit la même tendance : le plateau est plus important en allant vers la périphérie. De plus, au centre de la cellule (noyau et périnoyau), plus la cellule est invasive, plus le plateau diminue. Ceci n'est pas le cas à la périphérie où $G_N^0(\text{T24}) < G_N^0(\text{J82})$, suggérant encore une fois les caractéristiques particulières de la périphérie.

L'exposant a , qui représente la pente aux hautes fréquences, reste relativement constant à travers la cellule et ne permet pas de différencier les cellules en fonction de leur invasivité. Ceci rejoint les résultats trouvés dans le chapitre 3 où on observe que la perturbation du cytosquelette n'influence pas la pente a . Le paramètre b diminue en allant vers la périphérie, sauf dans le cas de J82. Ceci montre encore une fois les propriétés particulières de la périphérie de J82.

Le comportement viscoélastique aux hautes fréquences des cellules cancéreuses est important pour obtenir la fréquence de transition f_T qui semble être un paramètre discriminant. Pour les cellules RT112 et T24, f_T ne varie pas au niveau du noyau et périnoyau mais augmente à la périphérie, alors que pour J82, f_T augmente au périnoyau puis ne varie plus (Fig. 3.15). De plus, la fréquence se décale vers les

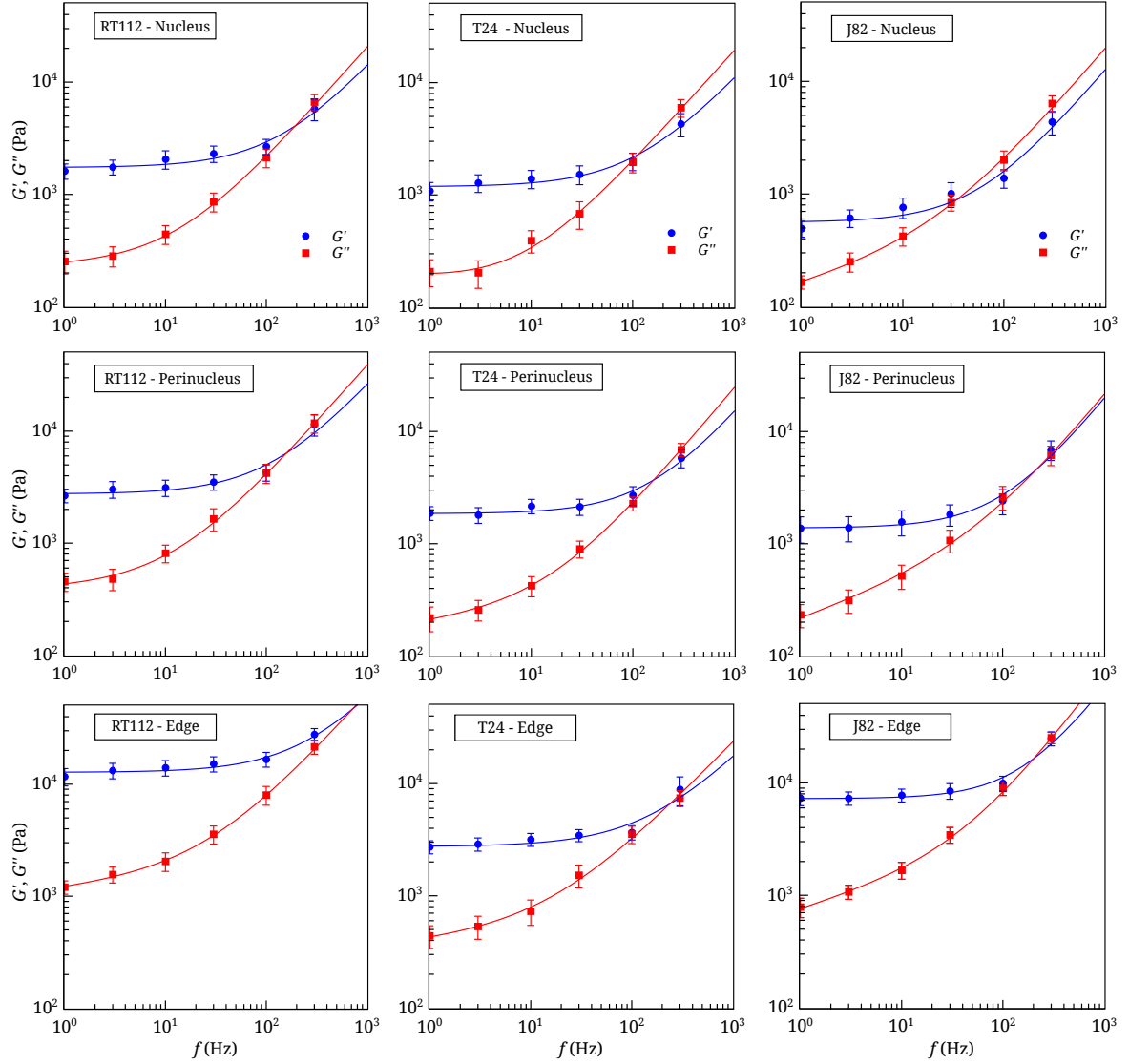


FIGURE 3.14 – Evolution de G' (cercle bleu) et G'' (carré rouge) au noyau (N), au périnoyau (P) et à la périphérie (E) – rangées de haut en bas respectivement – des trois lignées cancéreuses : RT112, T24 and J82 (gauche à droite, respectivement $N = 10$, $N = 20$, $N = 10$). Les courbes ont été ajustées avec le modèle (Eqs. 3.1)–(3.2).

plus petites fréquences lorsque l'invasivité augmente : la fréquence f_T semble être un marqueur de l'invasivité au niveau du noyau. La Fig. 3.16 montre l'évolution de G_N^0 et f_T en fonction de l'intensité de fluorescence normalisée. On observe que ces deux paramètres augmentent en allant vers la périphérie des cellules (sauf pour la J82). A la périphérie, f_T et G_N^0 suivent la même tendance. Ceci montre encore une fois que les propriétés à la périphérie sont critiques et peuvent être utilisées comme signature d'invasivité.

Des études ont été faites sur le lien entre l'invasivité et les propriétés mécaniques.

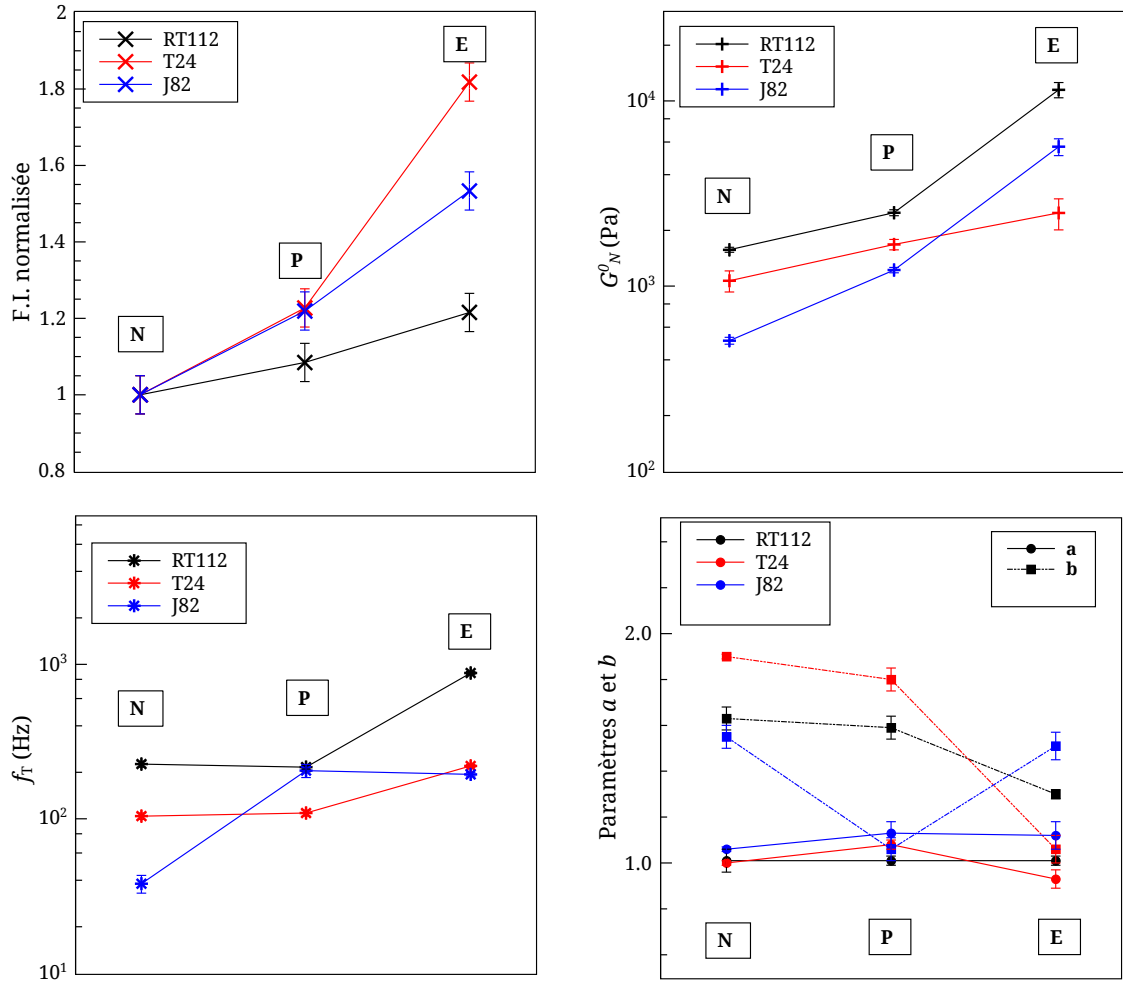


FIGURE 3.15 – Paramètres G_N^0 , f_T , a , b et F.I. des trois lignées cancéreuses : RT112 (noir), T24 (rouge) et J82 (bleu), en fonction de la position : noyau N, périnoyau P, périphérie E.

Ramos et al. (2014) ont mesuré le module d'Young de cellules de la vessie bénignes et cancéreuses au dessus du noyau en utilisant un AFM. Ils trouvent que les cellules normales sont plus rigides que les cellules cancéreuses et ils relient cette rigidité à une organisation en 3D des filaments d'actine. Rother et al. (2014) ont mesuré les propriétés viscoélastiques de lignées cellulaires différentes (malignes et bénignes) et ils montrent que le rapport G''/G' à 100 Hz augmente avec le potentiel métastatique des cellules cancéreuses. Ils n'ont pas fait de lien avec la microstructure de l'actine. Ces résultats confirment les mesures faites dans notre étude au dessus du noyau de cellules cancéreuses d'invasivité différente. De plus, nous avons mis en évidence deux paramètres qui sont marqueurs de l'invasivité : le plateau élastique G_N^0 et la fréquence de transition f_T .

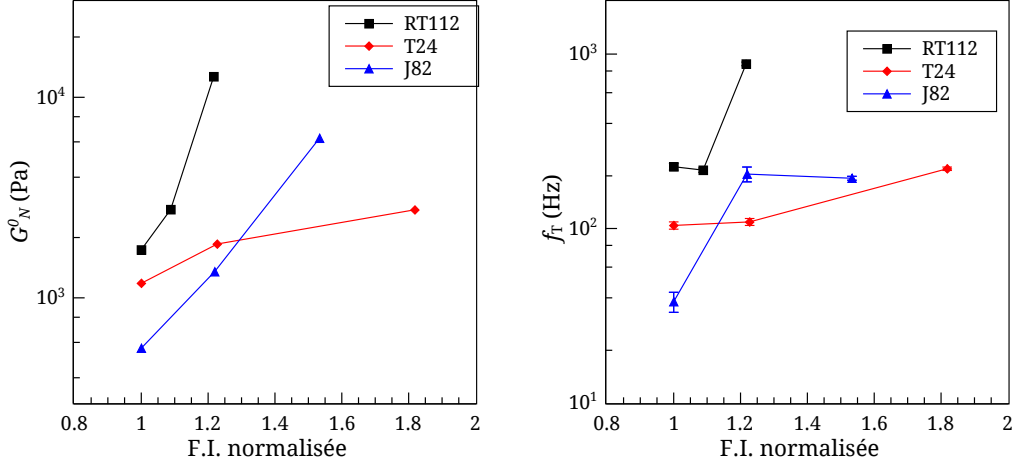


FIGURE 3.16 – Paramètres G_N^0 (gauche) et f_T (droite) en fonction de l'intensité de fluorescence normalisée F.I. des trois lignées cancéreuses : RT112 (noir), T24 (rouge) et J82 (bleu).

Paramètres	Lignée cellulaire	Noyau (N)	Périnoyau (P)	Périphérie (E)
FI normalisée	RT112	1 ± 0.05	1.09 ± 0.05	1.22 ± 0.05
	T24	1 ± 0.05	1.23 ± 0.05	1.81 ± 0.05
	J82	1 ± 0.05	1.22 ± 0.05	1.533 ± 0.05
FI (a.u)	RT112	26.0 ± 5	20 ± 5	35 ± 5
	T24	11 ± 1.1	13.5 ± 2.0	20 ± 2.4
	J82	49.8 ± 5	61 ± 15	80 ± 20
G_N^0 (Pa)	RT112	1738 ± 54	2756 ± 102	12701 ± 1200
	T24	1182 ± 154	1856 ± 120	2749 ± 524
	J82	561 ± 24	1350 ± 45	6254 ± 652
n_f	RT112	-0.01 ± 0.006	-0.27 ± 0.005	-0.1 ± 0.005
	T24	0.08 ± 0.005	-0.113 ± 0.005	-0.09 ± 0.005
	J82	-0.255 ± 0.005	-0.3 ± 0.005	-0.26 ± 0.005
a	RT112	1.01 ± 0.05	1.01 ± 0.02	1.01 ± 0.02
	T24	1.00 ± 0.01	1.08 ± 0.02	0.93 ± 0.04
	J82	1.06 ± 0.01	1.13 ± 0.05	1.12 ± 0.06
b	RT112	1.63 ± 0.05	1.59 ± 0.05	1.3 ± 0.02
	T24	1.9 ± 0.06	1.8 ± 0.02	1.5 ± 0.04
	J82	1.55 ± 0.05	1.06 ± 0.05	1.51 ± 0.06
f_T (Hz)	RT112	226 ± 10	160 ± 15	879 ± 21
	T24	104 ± 5	170 ± 15	220 ± 5
	J82	38 ± 5	205 ± 20	194 ± 5

TABLE 3.5 – L'intensité de fluorescence (FI) normalisée et les paramètres d'ajustement G_N^0 , n_f , a , et b déduits du modèle (Eqs. 3.1)–(3.2) pour les cellules RT112, T24 and J82. La fréquence de transition f_T est déduite en utilisant l'Eq. 3.4.

3.5 Conclusions

Une méthode nouvelle pour caractériser la rhéologie de cellules cancéreuses a été développée dans la gamme de fréquences [1-300 Hz], combinée à l'utilisation d'un modèle de rhéologie contenant des paramètres qui peuvent être utilisés pour décrire les propriétés mécaniques de la cellule. En comparant la microstructure de l'actine à la viscoélasticité des cellules cancéreuses par AFM, nous montrons que les propriétés sont locales et reliées à l'organisation du réseau d'actine dans la cellule. En particulier, nous montrons que la périphérie de la cellule est plus rigide que le centre du noyau. Afin de mieux comprendre la relation entre la viscoélasticité locale et la microstructure de l'actine, nous avons perturbé la polymérisation de l'actine et la contractilité acto-myosine. La LatrunculinA a causé la diminution des modules G' et G'' au noyau et périnoyau, mais pas à la périphérie. Y27632 a un effet similaire en plus d'augmenter le plateau G_N^0 . Ceci peut être corrélé à la réorganisation des filaments d'actine après l'inhibition de la contractilité ou à la présence d'une tension élastique passive à la périphérie. Nous avons aussi tenté de stabiliser les filaments d'actine avec la Jasplakinolide mais cette drogue a causé l'apparition d'agrégats d'actine, ce qui rend les interprétations difficiles. Ensuite, les propriétés mécaniques et la microstructure de trois lignées cellulaires cancéreuses ont été mesurées par AFM et nous avons trouvé deux paramètres pertinents pour différencier les cellules en fonction de leur invasivité. G_N^0 et f_T diminuent pour les cellules les plus invasives. Cependant, à la périphérie de la cellule la plus invasive (J82), ces deux paramètres augmentent. Ce nouveau résultat à la périphérie de la cellule peut être important quand les cellules transmigrent à travers les barrières vasculaires pendant la formation de métastases, puisque cela peut leur permettre d'exercer des tractions plus grandes pour passer à travers l'endothélium.

Une étude de l'influence de l'environnement externe sur ces propriétés va nous permettre de mieux comprendre le rôle de ces paramètres à la périphérie de la cellule.

Chapitre 4

Environnement et propriétés viscoélastiques

La matrice extracellulaire (ECM) est une composante principale du microenvironnement cellulaire. L'ECM forme un milieu entourant les cellules qui influence les fonctions et les processus de la cellule, dont la prolifération, l'adhésion, la migration, la différenciation ainsi que la mort cellulaire (Hynes, 2009). La diversité des fonctions de l'ECM est liée à sa structure très dynamique qui est constamment en remodelage et soumis à des processus de dégradation.

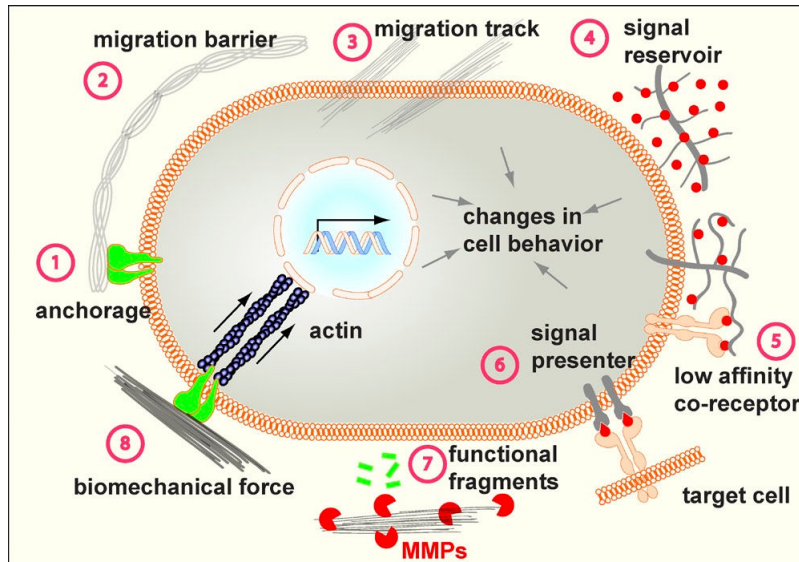


FIGURE 4.1 – Schéma du lien entre cellules et l'ECM. Les fonctions versatiles de l'ECM dépendent de la diversité de ses propriétés physiques, biochimiques et biomécaniques. L'ECM intervient dans l'ancrage des cellules, essentiel pour les divisions (1) et dans la migration des cellules (2-3). Il sert de médiateur des signaux chimiques (4-7). Et surtout, la cellule peut ressentir les propriétés mécaniques de l'ECM et modifier ses fonctions en conséquence (8). Source : (Lu et al., 2012). En retour, la cellule influence aussi les propriétés de l'ECM, comme dans le remodelage (Jordan et al., 2010).

Avant de mesurer l'influence de l'ECM sur les cellules cancéreuses, nous avons

étudié l'influence d'un substrat élastique et non remodelable comme les gels de polyacrylamides de rigidités différentes. Nous avons aussi mesuré les propriétés mécaniques de cellules cancéreuses sur une monocouche endothéliale et en transmigration à travers cette couche. Enfin, des mesures de cellules sur gel de collagène (4.5 mg/ml) ont été faites.

La difficulté de la mesure du comportement mécanique des cellules sur des substrats mous est que la correction de l'effet du substrat pour de faibles hauteurs n'est pas simple et aucune étude n'a traité du problème pour les modules G' et G'' . Pour les gels de polyacrylamide et HUVECs, les modules d'Young varient entre 5 et 28 kPa, alors que le module apparent de la cellule cancéreuse varie entre 1 et 15 kPa (en fonction de la position). Ainsi la correction que nous avons utilisée précédemment ne s'applique plus car elle suppose un substrat très rigide. Des calculs prenant en compte l'effet des substrats mous, basés sur l'étude de [Korsunsky and Constantinescu \(2009\)](#) sont en cours, et sont présentés ici. C'est pourquoi nous présentons d'abord les résultats bruts, puis ensuite corrigés par l'effet du substrat.

4.1 Environnement mécanique : gels de polyacrylamide

4.1.1 Préparation et rigidité des gels de polyacrylamide

Les gels de polyacrylamide que nous utilisons ici ne sont pas faits selon le même protocole qu'au chapitre 2. En effet, nous souhaitons que les cellules adhèrent à la surface des gels, or cela n'était pas possible avec ces gels. Nous avons donc suivi le protocole mis au point par [Grevesse et al. \(2013\)](#) pour fonctionnaliser des gels de polyacrylamide. Leur astuce est de rajouter un type d'acrylamide qui possède des liens -OH permettant l'ancrage de la fibronectine.

Un long processus de caractérisation et de développement a été nécessaire avant de pouvoir utiliser ces gels. Le protocole est détaillé en annexe C.

La mesure des propriétés mécaniques des gels a été faite par rhéométrie et AFM. La Fig. 4.2 montre le module d'Young en fonction de la concentration en bis-acrylamide mesuré sur un rhéomètre classique. Pour des concentrations de réticulants de [0.1 - 0.3 - 0.6] %w/w, le module d'Young varie entre 5 et 30 kPa, $E = [5 - 8 - 28 \text{ kPa}]$.

Les gels sont fonctionnalisés avec de la fibronectine (25 µg/ml) pendant 1h à température ambiante avant de déposer les cellules isolées.

4.1.2 L'influence des gels sur les propriétés de la cellule

La Fig. 4.3 présente quatre images de cellules T24 en épifluorescence sur du verre et sur trois gels de polyacrylamide. Les cellules ont été transfectées à l'actine-GFP et nous visualisons la densité d'actine au plan basal (contact entre la cellule et la

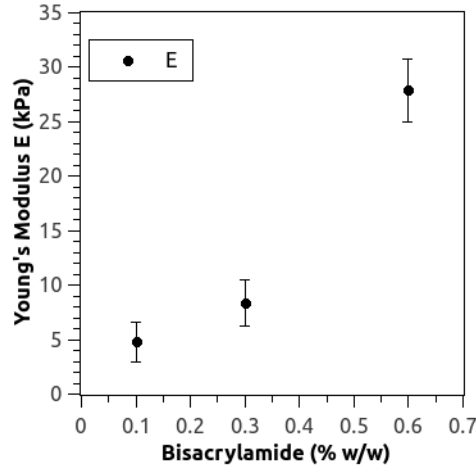


FIGURE 4.2 – Module d'Young des gels de polyacrylamide de concentration 3.2% en acrylamide en fonction de la concentration en bis-acrylamide. Respectivement $E = [5 - 8 - 28 \text{ kPa}]$ pour les concentrations respectives en bis-acrylamide $[0.1 - 0.3 - 0.6] \text{ \%w/w}$. Les mesures ont été effectuées avec un rhéomètre avec l'hypothèse $E \sim 3G'(1 \text{ Hz})$. $N = 15$ et les barres d'erreur sont les erreurs types de la moyenne (SEM).

surface). Qualitativement, on observe une différence importante de morphologie et de structure du réseau d'actine : sur verre, la cellule est étalée et les fibres d'actine sont bien définies, alors que sur les gels, l'actine est diffus et les cellules moins étalées. Toutefois, il est très difficile de pouvoir différencier entre l'influence des trois gels sur la morphologie. La différence de rigidité n'est peut-être pas suffisante pour montrer une différence de morphologie notable.

Les modules G' et G'' des cellules précédentes (RT112, T24, J82) sur un gel de 8 kPa ont été mesurés à trois positions différentes : noyau, périnoyau et périphérie (Fig. 4.4). Des mesures de modules ont aussi été effectuées sur des gels de rigidité $E = [5, 28 \text{ kPa}]$. Les courbes ne montrent pas de différences significatives en fonction de la rigidité et de l'invasivité, et ne sont pas présentées ici.

Pour chaque lignée cellulaire, les modules G' et G'' augmentent en allant vers la périphérie. Ceci est aussi observé quand les cellules sont sur verre. Cette tendance semble donc être indépendante du substrat.

En comparant chaque position entre les lignées cellulaires, on remarque qu'au dessus du noyau, le module G' diminue lorsque l'invasivité augmente. Notons aussi qu'il y a toujours un plateau élastique aux faibles fréquences. De même, la fréquence de transition est similaire pour RT112 et T24 mais est plus faible pour J82. A la périphérie de RT112 et T24, les modules G' et G'' sont similaires alors que pour la J82, il y a une grande différence. Ces mesures ne sont pas corrigées pour l'effet du substrat, il est donc difficile de conclure à ce stade.

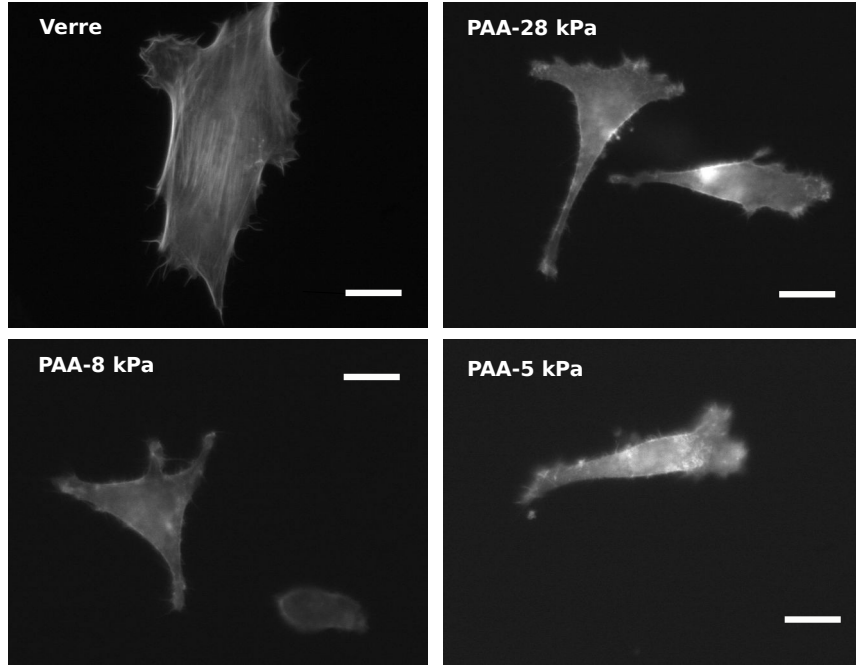


FIGURE 4.3 – Comparaison d’images en fluorescence de cellules T24 sur verre et sur gel de rigidité 5-8-28 kPa (plan basal). Les cellules sont plus étalées avec des fibres de stress bien définies sur le verre alors que sur le gel, l’actine est diffus. La barre d’échelle est de 10 μm .

4.2 Environnement biologique : monocouches endothéliales HUVECs

4.2.1 Propriétés mécaniques des HUVECs

Les propriétés mécaniques des HUVECs en monocouche ont été mesurées (Fig.4.5). On trouve que les HUVECs ont aussi un comportement viscoélastique avec une composante élastique prépondérante. Un plateau en G' aux petites fréquences apparaît et $G_N^0 \sim 3 \text{ kPa}$. En considérant que $E \sim 3G_N^0$ et que le coefficient de Poisson des HUVECs est $\nu = 0.5$, on trouve un module d’Young des HUVECs de 9kPa. Ces résultats concordent avec des mesures effectuées par [Vargas-Pinto et al. \(2013\)](#). Ils ont mesuré le module d’Young par AFM des HUVECs avec une pointe Bruker similaire aux pointes pyramidales que nous utilisons. Dans leur modèle de contact, pour déduire E , ils font varier le demi-angle θ entre 15° et 25° , et trouvent $6.6 \text{ kPa} < E < 11 \text{ kPa}$.

Ainsi, les mesures de modules sur le gel de 8 kPa et sur les HUVECS sont comparables.

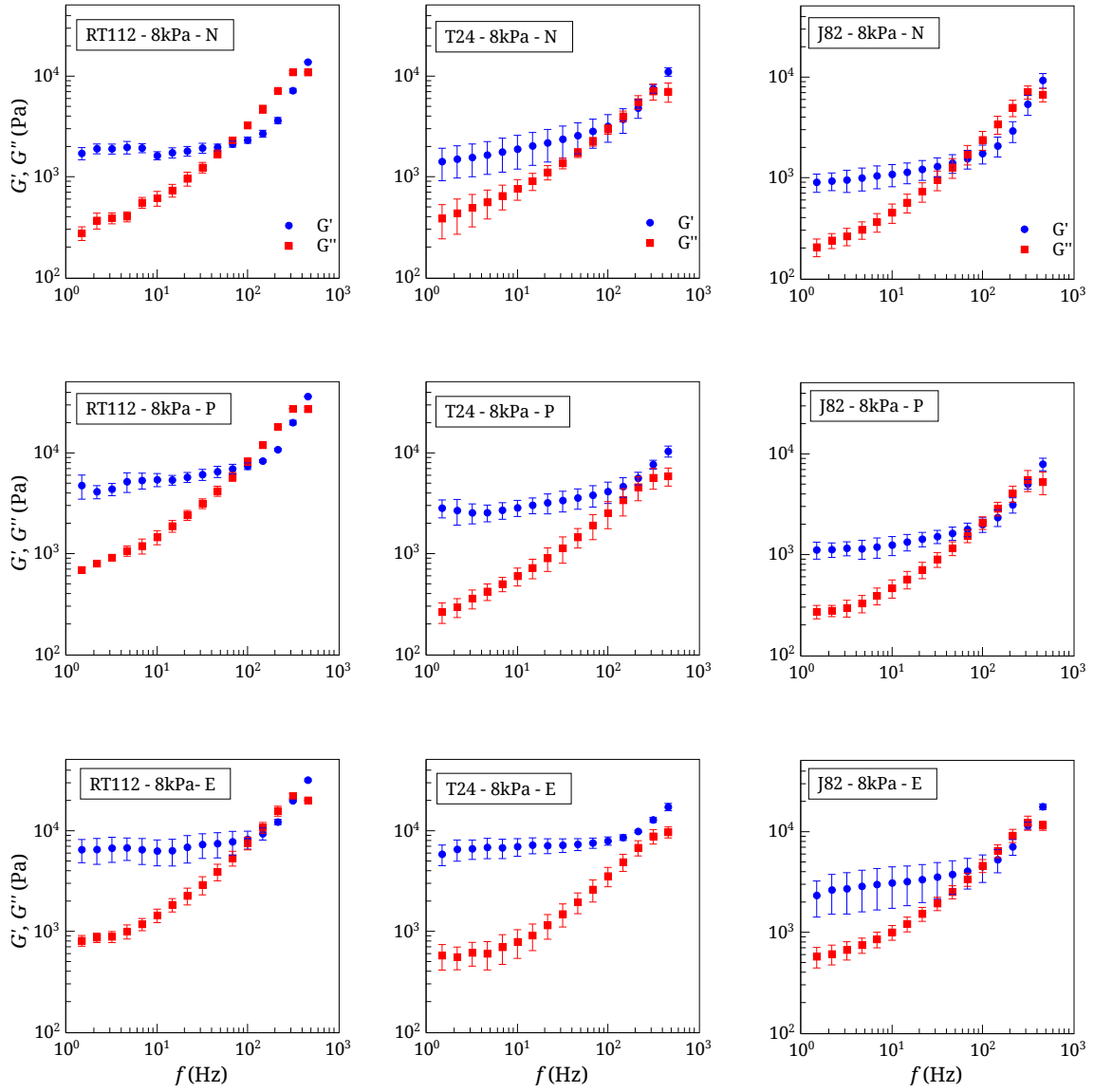


FIGURE 4.4 – Modules G' et G'' de trois lignées cellulaires sur un gel de 8kPa; $N = 5$ et les barres d'erreur sont les SEM.

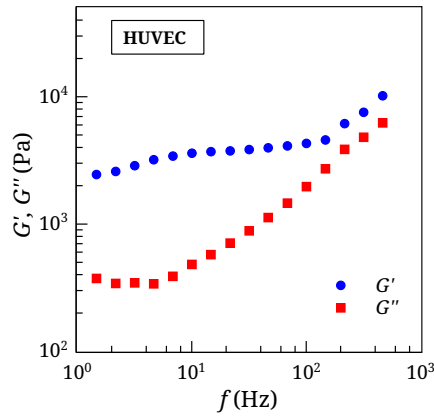


FIGURE 4.5 – Modules G' et G'' de cellules HUVECs; $N = 2$.

4.2.2 L'influence de la monocouche sur les propriétés de la cellule

La Fig. 4.6 montre une image prise d'une cellule T24 sur une monocouche d'HUVEC : l'étalement de la cellule est limitée et il n'y a pas de formation de grands lamellipodes. Il est donc difficile de déterminer des régions (P) et (E). C'est pourquoi nous avons mesuré les propriétés mécaniques de cellules cancéreuses sur la monocouche à deux positions : le noyau et le périnoyau.

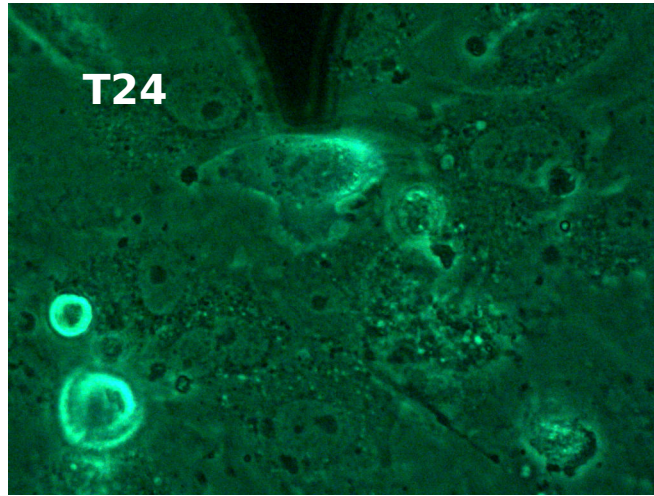


FIGURE 4.6 — Cellule T24 fluorescente sur une monocouche HUVEC. Le levier AFM est juste au-dessus de la cellule T24. La cellule ne s'étale pas et ne développe pas de grand lamellipode.

La Fig. 4.7 montre des images prises d'une cellule J82 sur la monocouche HUVEC en fonction du temps : la cellule ne prend pas la morphologie allongée habituelle des J82. A $t=0$, il n'y a pas de région périphérique bien définie. Après une dizaine de minutes, la cellule commence à s'étaler.

Les modules G' et G'' de cellules RT112, T24 et J82 sur une monocouche d'HUVEC ont été mesurés à deux positions différentes (Fig. 4.8).

Au noyau, le module G' diminue quand l'invasivité augmente. Ceci est accompagné par une diminution de la fréquence de transition. Les résultats au périnoyau sont différents et les modules G' et G'' sont supérieurs aux modules des deux autres cellules. De plus, les modules ne se croisent pas, ce qui suggère que le milieu est élastique. Ces résultats montrent encore que la cellule J82 a des caractéristiques bien particulières qui sont probablement liées à son invasivité.

Une comparaison entre l'influence de la monocouche d'HUVEC et d'un gel de polyacrylamide de 8 kPa est effectuée par la suite. Mais avant tout, il faut corriger l'effet du substrat.

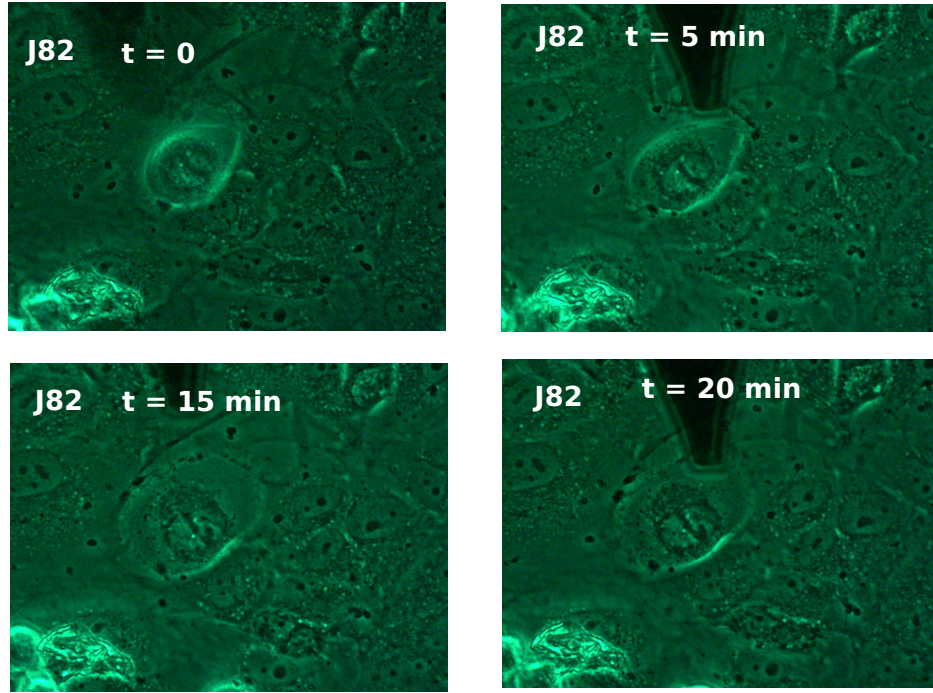


FIGURE 4.7 – Cellule J82 fluorescente sur une monocouche HUVEC aux instants $t=0$, $t=5$, $t=15$, $t=20$. La cellule ne prend pas la morphologie allongée habituelle des J82. Après une dizaine de minutes, la cellule commence à s'étaler.

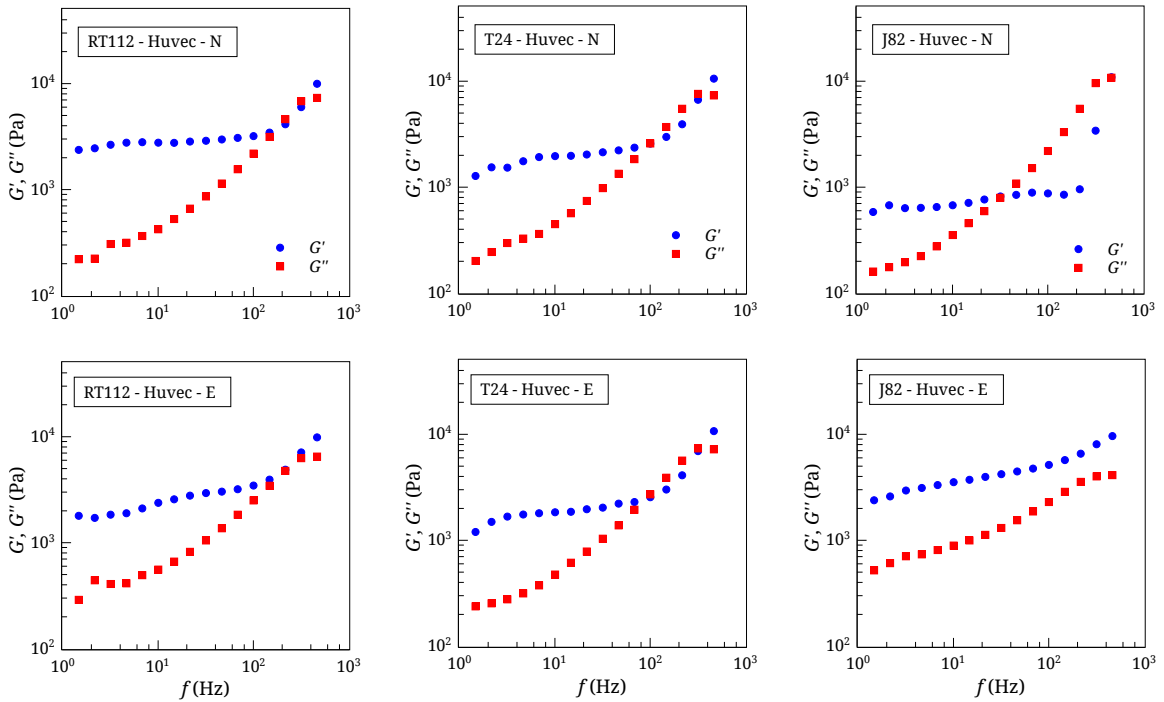


FIGURE 4.8 – Modules G' et G'' de trois lignées cellulaires sur une monocouche HUVEC. Ici, seuls les positions noyau (N) et périnoyau (P) ont été mesurées car les cellules ne s'étalent pas sur la monocouche, il est donc très difficile de définir une périphérie. $N = 2$ pour chaque lignée.

4.3 Correction de l'effet de substrats mous

4.3.1 Expression du module de cisaillement corrigé

Avec des substrats relativement mous, la correction de Santos et al. (2012) que nous avons utilisée précédemment n'est plus valide. En effet, pour cette correction on définit le substrat comme un demi-espace infiniment rigide.

Korsunsky and Constantinescu (2009) ont proposé une méthode de calcul du module élastique apparent \bar{E} pour les systèmes à deux couches. On note $\bar{E} = \frac{E}{1-\nu^2}$. La Fig. 4.9 schématise le système : une fine couche de module élastique \bar{E}_1 et de hauteur h repose sur une autre couche de module \bar{E}_2 d'épaisseur infinie, et une pointe indente la première couche d'une hauteur δ .

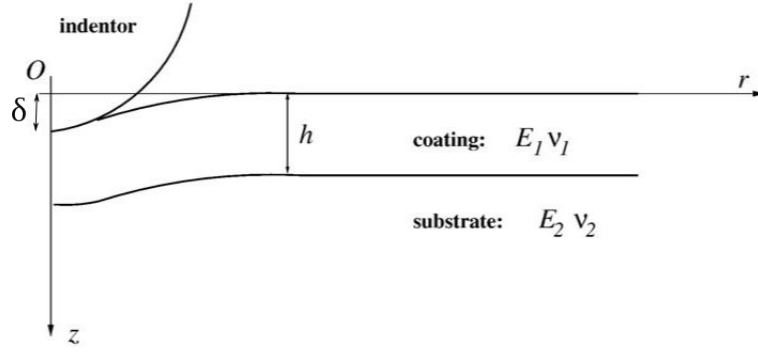


FIGURE 4.9 – Schéma du système d'indentation avec deux couches de rigidités différentes de propriétés E_1 et ν_1 et E_2 et ν_2 (Korsunsky and Constantinescu, 2009).

Korsunsky and Constantinescu (2009) ont calculé les solutions exactes par méthode d'intégration mais proposent un modèle simplifié pour décrire le module apparent, qui s'exprime de la façon suivante :

$$\bar{E}(\delta) = \bar{E}_2 + \frac{\bar{E}_1 - \bar{E}_2}{1 + \left(\frac{1}{\beta_0} \frac{\delta}{h}\right)^\eta} \quad (4.1)$$

où h est la hauteur du film (en l'occurrence la hauteur de la cellule dans notre cas), δ est la hauteur d'indentation de la pointe, et les paramètres \bar{E}_2 , \bar{E}_1 , β_0 et η sont des constantes positives. D'après les auteurs, cette expression est valable pour tous types de géométrie de la pointe dans le cas où $0.2 < \frac{\bar{E}_1}{\bar{E}_2} < 5$, ce qui correspond bien à notre étude. Le paramètre réduit $\frac{\delta}{\beta_0 h}$ montre le rôle combiné de δ et h .

Dans les cas limites (Fig.4.10) :

- Si h est très grand (ou si l'indentation δ est petite), le module apparent s'écrit $\bar{E} = \bar{E}_1$ qui est le module de la première couche, c'est-à-dire la cellule dans notre cas. Il n'y a plus de contribution du substrat.

- Si h tend vers zéro (ou si l'indentation δ est grande), le module apparent s'écrit $\bar{E} = \bar{E}_2$. Dans notre cas, cela est équivalent à la pointe du levier qui toucherait le substrat dans les régions très fines.

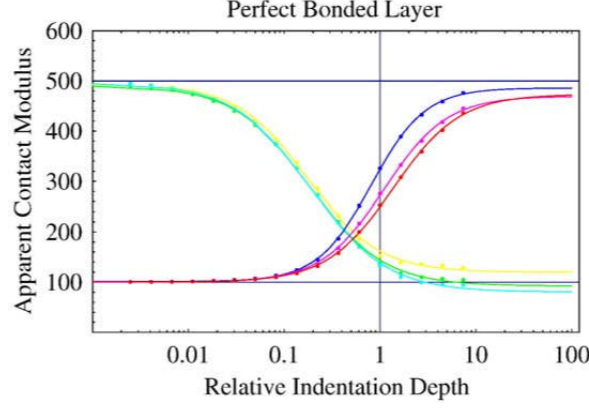


FIGURE 4.10 – Module de contact apparent \bar{E} en fonction de l'indentation relative $\frac{\delta_0}{\beta_0 h}$. Ici $\bar{E}_1=100$ et $\bar{E}_2=500$. Ainsi lorsque l'indentation relative est petite (h grand ou δ petit), nous retrouvons bien $\bar{E} = \bar{E}_1$. Source : (Korsunsky and Constantinescu, 2009)

Les cas limites sont cohérents. Dans notre cas, le module élastique apparent \bar{E} est ce que l'on mesure en AFM et \bar{E}_1 est le module de la cellule corrigé. Ainsi en utilisant le modèle de Korsunsky and Constantinescu (2009), on peut remonter à la valeur des modules élastiques de la cellule en fonction de la rigidité du substrat.

L'idée est de remplacer le module d'Young E dans l'équation de la force en fonction de l'indentation décrite par Bilodeau (Eq. 2.7) par cette expression du module apparent (Eq. 4.1).

$$F = \frac{3}{4} \bar{E} \tan \theta \delta^2 \quad (4.2)$$

où F est la force et δ l'indentation, et θ le demi angle de la pyramide.

En notant $\chi = \frac{\delta}{\beta_0 h}$ et $E(\chi) = \bar{E}$ le facteur de correction, l'équation 4.2 s'écrit :

$$F = \frac{3}{4} \tan \theta E(\chi) \delta^2 \quad (4.3)$$

avec

$$E(\chi) = \bar{E}_2 + \frac{\bar{E}_1 - \bar{E}_2}{1 + \chi^n} \quad (4.4)$$

Une oscillation de faible amplitude δ est rajoutée autour de l'indentation initiale δ_0 et l'équation 4.3 peut être linéarisée :

$$F_0 + F = \frac{3}{4} \tan \theta E\left(\frac{\delta_0}{\beta_0 h} + \frac{\delta}{\beta_0 h}\right) (\delta_0 + \delta)^2 \quad (4.5)$$

En ne gardant que les termes de premier ordre, on obtient :

$$F = \frac{3}{2} \tan \theta \delta_0 \left(E(\chi_0) + \frac{\chi_0}{2} E'(\chi_0) \right) \delta \quad (4.6)$$

avec

$$E'(\chi) = \frac{dE}{d\chi}(\chi) \quad (4.7)$$

Le facteur de correction s'écrit :

$$E(\chi_0) = E\left(\frac{\delta_0}{\beta_0 h}\right) = \bar{E}_2 + \frac{\bar{E}_1 - \bar{E}_2}{1 + \left(\frac{\delta_0}{\beta_0 h}\right)^\eta} \quad (4.8)$$

et la dérivée du facteur de correction par rapport à χ s'écrit :

$$E'(\chi_0) = -(\bar{E}_1 - \bar{E}_2) \frac{\eta}{\beta_0 h} \frac{(\chi_0)^{\eta-1}}{(1 + (\chi_0)^\eta)^2} \quad (4.9)$$

D'où

$$E(\chi_0) + \frac{\chi_0}{2} E'(\chi_0) = \bar{E}_2 + (\bar{E}_1 - \bar{E}_2) \left(\frac{1}{1 + \chi_0^\eta} - \frac{\eta}{2} \frac{\chi_0^\eta}{(1 + \chi_0^\eta)^2} \right) \quad (4.10)$$

avec

$$\chi_0 = \frac{\delta_0}{\beta_0 h} \quad (4.11)$$

Vérifions les conditions limites :

- Quand h est grand, on retombe bien sur \bar{E}_1
- Quand h tend vers zéro, on retrouve \bar{E}_2

Il s'agit à présent de passer dans le domaine fréquentiel pour extraire le module de cisaillement. On a :

$$\frac{F}{\delta} = \frac{3}{2} \tan \theta \delta_0 \left[\bar{E}_2 + (\bar{E}_1 - \bar{E}_2) \left(\frac{1}{1 + \chi_0^\eta} - \frac{\eta}{2} \frac{\chi_0^\eta}{(1 + \chi_0^\eta)^2} \right) \right] \quad (4.12)$$

$$\frac{F}{\delta} = \frac{3}{2} \tan \theta \delta_0 \left[\bar{E}_2 + (\bar{E}_1 - \bar{E}_2) \left(\frac{1 + \chi_0^\eta(1 - \frac{\eta}{2})}{(1 + \chi_0^\eta)^2} \right) \right] \quad (4.13)$$

Avec la relation $\bar{E}_1 = \frac{E_1}{1 - \nu_1^2} = \frac{G_1 2(1 + \nu_1)}{1 - \nu_1^2} = \frac{2G_1}{1 - \nu_1}$, l'équation (4.13) peut être réécrite :

$$\bar{E}_1 = \frac{2G_1}{1 - \nu_1} = \bar{E}_2 + \left[\frac{F}{\delta} \frac{2}{3 \tan \theta \delta_0} - \bar{E}_2 \right] \left(\frac{(1 + \chi_0^\eta)^2}{1 + \chi_0^\eta(1 - \frac{\eta}{2})} \right) \quad (4.14)$$

$$G_1 = \frac{F}{\delta} \frac{(1 - \nu_1)}{3 \tan \theta \delta_0} \left(\frac{(1 + \chi_0^\eta)^2}{1 + \chi_0^\eta(1 - \frac{\eta}{2})} \right) + \frac{\bar{E}_2 (1 - \nu_1)}{2} \left(1 - \frac{(1 + \chi_0^\eta)^2}{1 + \chi_0^\eta(1 - \frac{\eta}{2})} \right) \quad (4.15)$$

En notant

$$k(\chi_0) = \frac{(1 + \chi_0^\eta)^2}{1 + \chi_0^\eta(1 - \frac{\eta}{2})} \quad (4.16)$$

L'équation (4.15) se simplifie de la façon suivante :

$$G_1 = \frac{F}{\delta} \frac{(1 - \nu_1)}{3 \tan \theta \delta_0} k(\chi_0) + \frac{\bar{E}_2(1 - \nu_1)}{2} [1 - k(\chi_0)] \quad (4.17)$$

En notant $F^*(\omega)$ et $\delta^*(\omega)$ les modules complexes de F et δ , et $\bar{E}_2^* = \frac{E_2^*}{1 - \nu_2^2}$, le module de cisaillement complexe s'écrit :

$$G^*(\omega) = G_1^*(\omega) = \frac{F^*(\omega)}{\delta^*(\omega)} \frac{(1 - \nu_1)}{3 \tan \theta \delta_0} k(\chi_0) + \frac{E_2^*(1 - \nu_1)}{2(1 - \nu_2^2)} [1 - k(\chi_0)] \quad (4.18)$$

De plus, la contribution de la traînée hydrodynamique est aussi corrigée de la même façon qu'au chapitre 2.

4.3.2 Application au gel et monocouche d'HUVEC

Prenons le cas des mesures de modules sur des cellules T24 adhérentes sur un gel de polyacrylamide. Les valeurs possibles des paramètres sont les suivantes :

$$\left\{ \begin{array}{l} \nu_1 \approx \nu_2 \approx 0.5 \\ E_2 = [5 - 8 - 28] \text{ kPa} \\ \delta_0[\text{E, P, N}] = [100 - 400 - 500] \text{ nm} \\ h[\text{E, P, N}] = [200 - 1000 - 10000] \text{ nm} \\ \beta_0 = 1.1 \\ \eta = 1.4 \\ \theta = 18.75^\circ \end{array} \right. \quad (4.19)$$

où $\delta_0[\text{E, P, N}]$ correspond à l'indentation initiale à la périphérie (E), au périnoyau (P) et au noyau (N).

Les valeurs des paramètres d'ajustement β_0 et η sont choisies à partir des simulations effectuées par [Korsunsky and Constantinescu \(2009\)](#) dans leur article : ils trouvent $0.8 < \beta_0 < 1.37$ et $1.25 < \frac{\eta}{2} < 1.55$. Nous utilisons une valeur moyenne. Pour la hauteur h , nous prenons les valeurs mesurées sur verre puisqu'il est très difficile de mesurer la hauteur des cellules sur un substrat mou.

L'indentation relative $\chi_0(\delta_0; h)$ varie en fonction de la région :

$$\begin{cases} \chi_0(100 \text{ nm}; 200 \text{ nm}) = 0.45 & \text{périphérie} \\ \chi_0(400 \text{ nm}; 1000 \text{ nm}) = 0.36 & \text{périnoyau} \\ \chi_0(500 \text{ nm}; 10000 \text{ nm}) = 0.045 & \text{noyau} \end{cases} \quad (4.20)$$

Le facteur $k(\chi_0)$ varie en fonction de la région :

$$\begin{cases} k(\chi_0(100 \text{ nm}; 200 \text{ nm})) = 1.612 & \text{périphérie} \\ k(\chi_0(400 \text{ nm}; 1000 \text{ nm})) = 1.439 & \text{périnoyau} \\ k(\chi_0(500 \text{ nm}; 10000 \text{ nm})) = 1.023 & \text{noyau} \end{cases} \quad (4.21)$$

Ainsi, une fois k calculé, on peut obtenir les modules élastiques et visqueux selon l'équation 4.18 à partir des données F et δ en remplaçant directement l'expression de G dans le code matlab que nous utilisons pour déduire G^* .

Les résultats de la correction de l'effet du substrat sur les propriétés mécaniques de cellules T24 adhérentes sur un gel de 8 kPa aux trois positions sont présentés en Fig. 4.11.

Les modules G' et G'' corrigés diminuent légèrement au noyau, mais augmentent au périnoyau et à la périphérie. Cela suggère que sur un gel mou, les matériaux qui sont de même rigidité ou plus rigides que le gel vont apparaître comme plus mous, ce qui est logique. En effet, sans correction, le périnoyau et la périphérie ont un module d'Young apparent supérieur au module d'Young du gel.

Les corrections ont aussi été faites pour des cellules adhérentes sur une monocouche d'HUVEC (Fig. 4.12). Les modules au noyau ne sont pas beaucoup modifiés. D'ailleurs le G'' est presque identique avant et après correction. Au périnoyau, les modules augmentent après correction, et les modules G' ne suivent pas la même tendance qu'au noyau.

4.4 Discussion et comparaison entre différents environnements

La Fig. 4.13 représente les paramètres G_N^0 et f_T des trois lignées cellulaires en fonction de la rigidité des substrats (gels de rigidité $E=[5, 8, 28 \text{ kPa}]$ et le verre) déduits de l'ajustement des données par le modèle simplifié. Les données sur gel ont été corrigées selon la correction présentée dans ce chapitre alors que les corrections de l'effet du verre sont faites selon la méthode présentée dans le chapitre 2.

On remarque que G_N^0 et f_T ont une variation monotone en fonction de la rigidité E_2 dans le cas des trois lignées. Les autres paramètres comme la pente a ou le paramètre b ne sont pas discriminants et ne sont pas représentés.

En particulier :

- Au noyau : quand l'invasivité augmente, la pente $\frac{dG_N^0}{dE_2} \approx 0$ et $\frac{df_T}{dE_2} \approx 0$. Donc

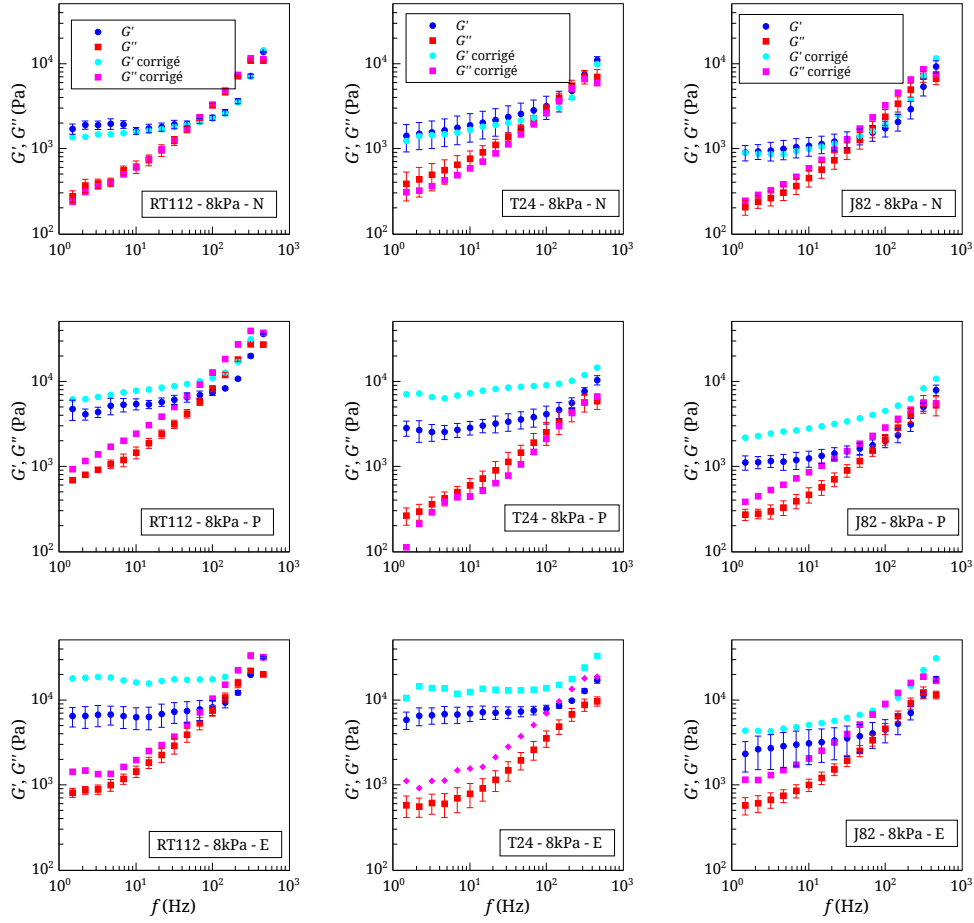


FIGURE 4.11 – Correction de l’effet du substrat (gel de polyacrylamide $E_2 = 8$ kPa) de cellules RT112, T24 et J82 aux trois positions : noyau (N), périnoyau (P), périphérie (E) ; $N = 5$, les barres d’erreur sont les erreurs types de la moyenne (SEM). Les modules diminuent au noyau mais pas à la périphérie où la correction est plus importante.

il n’y pas d’influence significative de la rigidité du substrat quelle que soit la lignée cancéreuse

- Au périnoyau et à la périphérie : quand l’invasivité augmente, les pentes $\frac{dG_N^0}{dE_2}$ et $\frac{dfT}{dE_2}$ augmentent.

Ceci suggère que la périphérie des cellules les plus invasives est plus sensible aux éléments mécaniques de l’environnement. Ceci pourrait être un atout lorsque la cellule cancéreuse migre d’un environnement à l’autre.

La comparaison avec le verre montre que G_N^0 est plus faible sur le verre en tout point de la cellule. Il y a deux raisons possibles pour cet effet : les cellules se rigidifient lorsqu’elles se retrouvent sur un gel plus mou ($E_2 < E_1$), mais ceci est en contradiction avec nos résultats sur gel. Dans la littérature, [Solon et al. \(2007\)](#) ont montré que des cellules cultivées sur des gels de polyacrylamide et sur du verre ont un module d’Young augmentant avec la rigidité. L’autre possibilité est que la hauteur considérée dans le cas du gel n’est pas la véritable hauteur. Des études plus complémentaires sont encore nécessaires pour trouver une méthode de calcul tenant

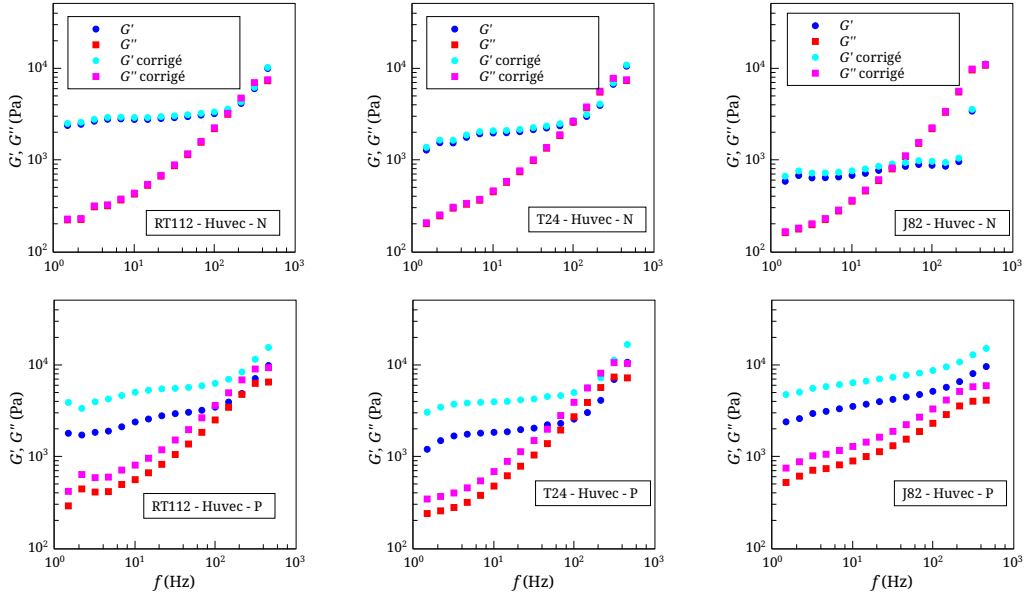


FIGURE 4.12 – Correction de l'effet du substrat (monocouche HUVEC 9 kPa) de cellules RT112, T24 et J82 aux trois positions : noyau (N), périnoyau (P), périphérie (E) ; $N = 2$.

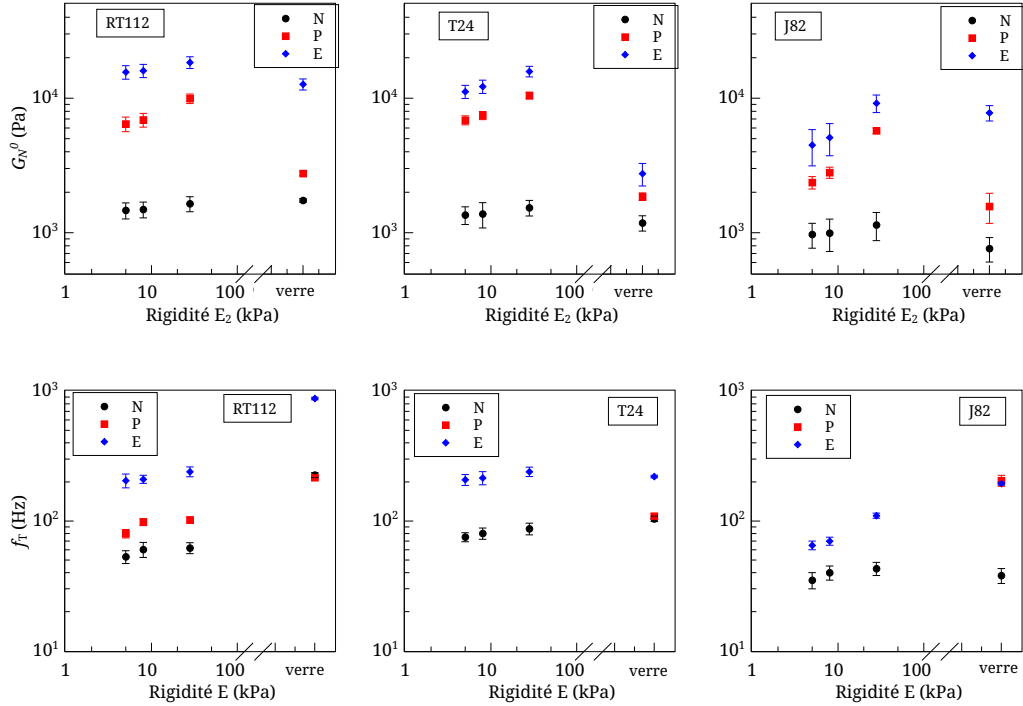


FIGURE 4.13 – G_N^0 (haut) et f_T (bas) en fonction de la rigidité du substrat ($E_{\text{gel}}=5, 8, 28$ kPa et verre) de cellules RT112, T24 et J82 aux trois positions : noyau (rond noir), périnoyau (carré rouge), périphérie (losange bleu).; $N = 5$, les barres d'erreur sont les erreurs types de la moyenne (SEM). Remarque : les fréquences de transition au périnoyau de T24 et de J82 ne sont pas représentées car dans ces cas-là les courbes ne se croisent pas.

compte de toutes les rigidités du substrat.

Néanmoins, les comparaisons des deux paramètres en fonction de la rigidité des gels fournissent des résultats intéressants qui montrent que la périphérie des cellules les plus invasives a une plus grande capacité d'adaptation mécanique à l'environnement. Ceci pourrait être efficace lors de la transmigration à travers des monocouches.

L'effet d'un gel de polyacrylamide et d'une monocouche de HUVECs (de rigidité proche du gel) a été comparé pour les trois lignées cellulaires. Les paramètres G_N^O et f_T sont représentés en fonction de deux positions (noyau et hors noyau) de cellules sur gel de 8 kPa et sur une monocouche HUVEC de 9 kPa (Fig. 4.14).

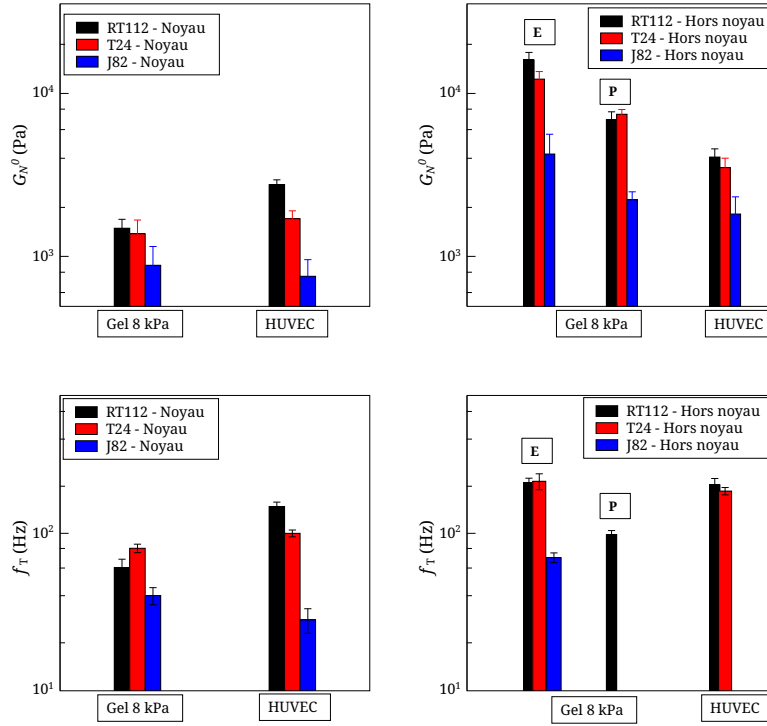


FIGURE 4.14 – G_N^O (haut) et f_T (bas) pour un gel de $E=8\text{kPa}$ et des HUVECs ($E=9\text{kPa}$) de cellules RT112 (rouge), T24 (noir) et J82 (bleu) aux deux positions : noyau (gauche) et hors noyau (gauche). Dans le cas du gel 8 kPa, les valeurs au périnoyau et à la périphérie sont représentées. $N = 5$ dans le cas des gels et $N = 2$ dans le cas des HUVECs et les barres d'erreur sont les erreurs types moyennes (SEM).

Au noyau (Fig. 4.14 gauche), G_N^O diminue quand l'invasivité augmente dans les deux cas. L'influence de l'invasivité suit donc la même tendance sur les deux substrats (gel et HUVEC). Néanmoins, ce qui est remarquable est le fait que sur les HUVECs, l'influence de l'invasivité sur G_N^O est plus significative. Ceci est aussi montré avec la fréquence de transition qui diminue plus significativement que sur les gels. Ainsi sur une monocouche d'HUVEC, l'invasivité des cellules joue un rôle plus important sur les propriétés mécaniques.

Hors noyau, G_N^0 sur HUVEC est inférieur au G_N^0 sur gel pour toutes les lignées. Ainsi la monocouche d’HUVEC tend à diminuer la rigidité à la périphérie des cellules cancéreuses (par rapport au gel).

Nos résultats montrent que la diminution de la rigidité des cellules est liée à une augmentation de l’invasivité. Ainsi la diminution de la rigidité des cellules les plus invasives sur une monocouche pourrait être liée au fait que la cellule s’adapte pour traverser les cellules endothéliales. La périphérie étant plus rigide que le reste de la cellule, elle pourrait initier la traversée de la monocouche et le noyau suivrait.

Comparons à présent l’influence de la monocouche d’HUVEC sur les propriétés mécaniques des cellules par rapport aux trois gels de polyacrylamide. La Fig. 4.15 montre les paramètres G_N^0 et f_T en fonction des quatre substrats au noyau et hors noyau :

- RT112 et T24 : le G_N^0 sur HUVEC ne s’aligne pas avec les valeurs sur gels (cercle bleu). En effet, au noyau (en noir), G_N^0 augmente alors que hors noyau (en rouge), il diminue. La fréquence f_T augmente sur HUVECs.
- J82 : G_N^0 sur HUVEC diminue non significativement par rapport aux valeurs sur gel.

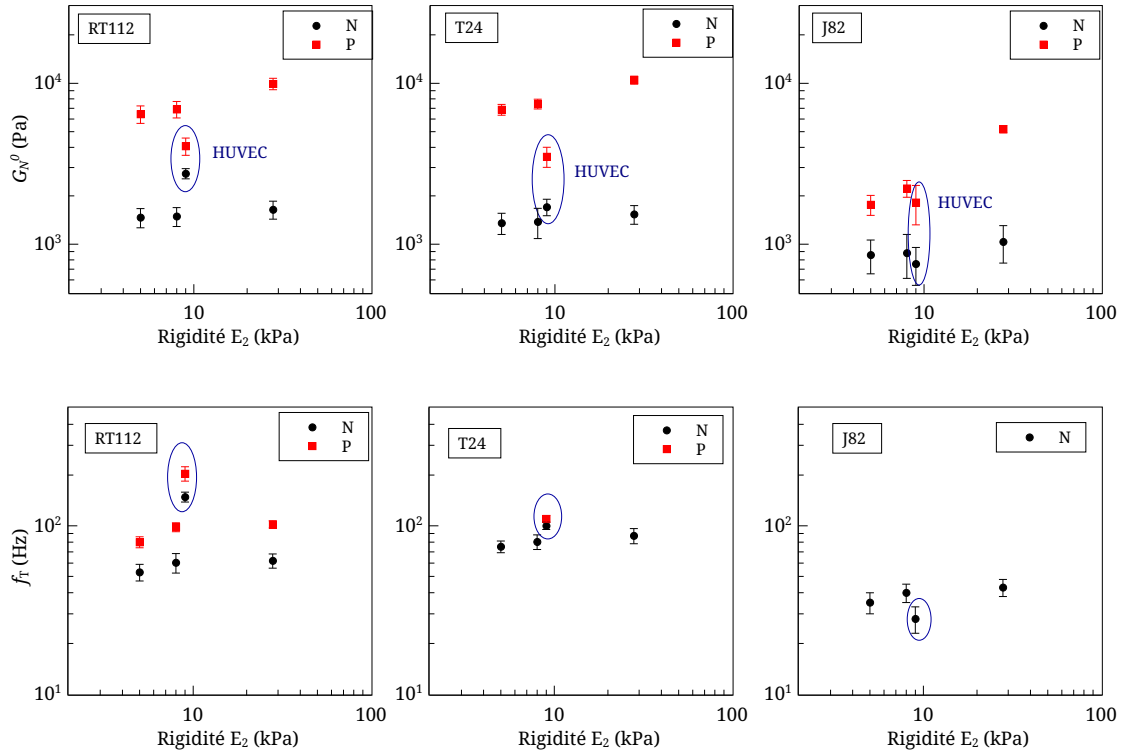


FIGURE 4.15 – G_N^0 (haut) et f_T (bas) pour les trois gels de polyacrylamide ($E_{\text{gel}}=[5, 8, 28 \text{ kPa}]$) et les HUVECs ($E=9\text{kPa}$, ellipse bleu) de cellules RT112, T24 et J82 aux deux positions : noyau (noir) et hors noyau (rouge). Dans le cas hors noyau sur T24 et J82, il n’y a pas de fréquence de transition.

Cette comparaison permet de mettre en évidence l'influence de la monocouche sur les paramètres :

- G_N^0 et f_T diminuent quand l'invasivité de la cellule augmente.
- La périphérie de la cellule est toujours plus rigide que le reste de la cellule quelle que soit la lignée cellulaire et le substrat.
- G_N^0 est relié à l'invasivité : plus la cellule est invasive, moins elle est rigide.
- Sur une monocouche d'HUVEC, l'invasivité a plus d'influence sur les paramètres au noyau. Les cellules sont donc plus sensibles quand l'environnement est constitué de cellules endothéliales
- Sur une monocouche d'HUVEC, la rigidité de la périphérie diminue alors que le noyau devient plus rigide. Cela suggère que sur un environnement où les cellules peuvent transmigrer, la cellule s'adapte de façon à rendre sa périphérie moins rigide pour faciliter la traversée de la monocouche.

Grâce à notre méthode de correction, il est possible de comparer les propriétés mécaniques de cellules cancéreuses d'invasivités différentes en fonction du substrat à plusieurs positions. Ceci permet de mettre en évidence des propriétés mécaniques très particulières, notamment le fait que les cellules les plus invasives sont plus sensibles à la rigidité de substrat, et que l'effet de la monocouche d'HUVEC est de rendre la périphérie moins rigide. La cellule ajusterait donc les propriétés mécaniques de sa périphérie pour initier la traversée de la monocouche et le noyau suivrait en étant entraîné par le reste de la cellule.

Chapitre 5

Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de l'étude du rôle du micro-environnement sur les propriétés mécaniques de cellules cancéreuses de la vessie par AFM.

Avant de pouvoir étudier l'effet du micro-environnement, nous avons montré que l'utilisation de l'AFM en mode modulation de force avec une pointe pyramidale permet une étude quantitative des propriétés mécaniques de gels de polyacrylamide et de cellules sur une large gamme de fréquence $f = [1-500 \text{ Hz}]$. Les forces appliquées ainsi que les conditions expérimentales sont parfaitement contrôlées. Les données de force et d'indentation mesurées par AFM donnent accès au module complexe qui s'écrit $G^* = G' + iG''$ où G' est le module élastique et G'' le module visqueux. Des corrections de l'effet de la traînée hydrodynamique et de l'effet du substrat sont rajoutées à l'expression du module. Par ailleurs, l'utilisation d'une pointe pyramidale permet des mesures localisées sur la cellule sur laquelle nous définissons trois régions d'intérêt : le noyau, le périnoyau et la périphérie.

Nous proposons aussi un modèle aux dérivées fractionnaires (simplifié dans le cas des cellules) qui met en évidence des paramètres pertinents pour l'étude de la viscoélasticité des gels et des cellules vivantes : G_N^0 représente le plateau de G' aux faibles fréquences, f_T est la fréquence de transition (G' et G'' se croisent), a est la pente aux hautes fréquences et b le rapport G''/G' aux hautes fréquences.

Avant d'utiliser cette méthode sur les cellules, nous l'avons validée avec des gels de polyacrylamide ([Abidine et al., 2015a](#)). Les modules G' et G'' ont été mesurés avec deux techniques différentes (rhéométrie et AFM) sur deux plages de fréquences ($f = [0.001-5 \text{ Hz}]$ et $[1-500 \text{ Hz}]$ respectivement), et il y a concordance entre les deux techniques. Par ailleurs, un ajustement avec un modèle aux dérivées fractionnaires montre que les paramètres G_N^0 et f_T évoluent en loi de puissance de la concentration en acrylamide c ($G_N^0 \sim c^{3.0}$ et $f_T \sim c^{1.6}$). Ces paramètres peuvent être donc utilisés pour caractériser les propriétés viscoélastiques des gels de polyacrylamide.

Le comportement viscoélastique des cellules est similaire pour toutes les lignées cellulaires (RT112, T24 et J82) : G' et G'' varient en fonction de la fréquence. Aux faibles fréquences, G' est supérieur à G'' et un plateau pour G' est présent jusqu'à environ 10 Hz, puis les modules G' et G'' se croisent et continuent à augmenter avec

la même pente.

Pour caractériser l'influence du cytosquelette sur les propriétés mécaniques des cellules, des mesures sont effectuées aux trois positions différentes de la cellule. La combinaison des mesures mécaniques par AFM et d'images confocales de cellule T24 avec le signal de fluorescence de l'actine permet de relier viscoélasticité et microstructure de l'actine. Nos résultats montrent que les propriétés mécaniques sur verre sont hétérogènes à travers la cellule et la périphérie de la cellule est plus rigide. En effet, l'augmentation de G_N^0 et f_T en allant vers la périphérie est liée à l'augmentation de l'intensité de fluorescence d'actine. Ainsi, plus l'intensité d'actine est importante, plus le milieu est rigide et moins la composante visqueuse est importante.

Pour mieux identifier le rôle de l'actine dans les propriétés mécaniques, nous avons perturbé sa structure à l'aide de drogues. La Latrunculin A qui inhibe la polymérisation de l'actine, entraîne une diminution de G_N^0 sauf à la périphérie où le module reste constant. Ceci est relié à une disparition de la fréquence de transition (les modules ne se croisent plus). La périphérie devient donc plus rigide. Par ailleurs, la drogue Y27632 qui inhibe la contractilité acto-myosine, entraîne une diminution de G_N^0 sauf à la périphérie où G_N^0 augmente. Ces résultats ne sont pas directement reliés à l'intensité de fluorescence qui évolue différemment. Le réarrangement des fibres par d'autres protéines de la famille Rho au niveau de la périphérie peut en être la raison. Une autre hypothèse est la présence d'une tension élastique passive à la périphérie.

La mesure des modules sur trois lignées de cellules (RT112, T24 et J82) d'invasivité différente (RT112 étant la moins invasive et J82 la plus invasive) montre que les paramètres G_N^0 et f_T sont des marqueurs de l'invasivité. Ces deux paramètres diminuent pour les cellules les plus invasives au niveau du noyau. Cependant, nous montrons qu'à la périphérie des J82, ils augmentent. Ceci peut être relié à la morphologie particulière de ces cellules qui sont plus étalées avec des fibres de stress très longues.

Enfin, l'influence du micro-environnement a été étudié en mesurant les modules de cellules adhérentes sur des gels de polyacrylamide de rigidité $E = 5, 8, 28$ kPa et sur une monocouche d'HUVEC, $E = 9$ kPa. Un défi particulier concerne la correction de l'effet du substrat sur les modules au péricaryon et à la périphérie. En appliquant une nouvelle méthode de correction sur des cellules d'invasivité différente, nous avons mis en évidence des propriétés mécaniques particulières de la périphérie. En effet, la périphérie des cellules les plus invasives (J82) est plus sensible à la rigidité de substrat. De plus, des comparaisons entre gel (8kPa) et monocouche d'HUVEC (9 kPa) montrent que l'invasivité des cellules jouent un rôle plus important sur HUVEC : la périphérie est moins rigide quand les cellules sont sur une monocouche (tout en restant plus rigide que le reste de la cellule). Ceci peut être éventuellement relié au fait que les cellules invasives essaient de transmigration au travers de la monocouche : la cellule diminuerait la rigidité de sa périphérie de façon à pouvoir initier la traversée de la monocouche, et le noyau (moins rigide que la périphérie) serait entraîné par le

reste de la cellule dans ce processus de transmigration.

A travers toutes nos études, nous avons pu mettre en évidence des liens entre propriétés mécaniques, cytosquelette d'actine, invasivité et micro-environnement. Les cellules cancéreuses n'ont pas du tout le même comportement viscoélastique au noyau et hors noyau en fonction de l'invasivité et de l'environnement. Cette particularité à la périphérie doit permettre aux cellules très invasives de mieux s'adapter mécaniquement à l'environnement et ainsi montre son rôle majeur.

De nombreuses pistes restent toutefois à explorer pour continuer à caractériser l'effet de l'environnement sur les propriétés mécaniques de cellules cancéreuses d'invasivité différente. Pour l'instant, deux types de substrats ont été utilisés : des gels de polyacrylamide dont la rigidité est ajustée en fonction de la concentration en réticulant (bis-acrylamide) et un substrat biologique (monocouche d'HUVEC). Nous pourrions aller plus loin dans la caractérisation de l'effet des substrats biologiques en utilisant des monocouches de cellules musculaires ou de cellules cancéreuses. Il serait aussi intéressant de varier la topographie des substrats comme par exemple des substrats sinusoïdaux ou dans un puits.

Une autre piste serait de caractériser l'influence de la surface d'adhésion des cellules sur les propriétés mécaniques. En effet, comme nous le montrons, les propriétés mécaniques de la cellule changent en fonction de la position, et ceci est relié à l'organisation spatiale hétérogène du cytosquelette d'actine. Quand la cellule n'a pas de contrainte d'adhésion, elle est étalée et forme des fibres d'actine (sur verre). Sur des motifs d'adhésion ("patterns"), la cellule doit avoir une organisation du cytosquelette différente, surtout au niveau de la périphérie ([Rigato et al., 2015](#)).

Enfin, la transmigration étant un sujet majeur d'étude, il serait intéressant de pouvoir mesurer les propriétés mécaniques de cellules cancéreuses lors de la transmigration (à travers une monocouche d'HUVEC). L'idée serait de cultiver une monocouche d'HUVEC sur un gel de polyacrylamide, de déposer des cellules cancéreuses dessus et de mesurer leurs propriétés mécaniques pendant la transmigration. Ces mesures couplées à la microscopie confocale pourrait apporter des informations sur le rôle de la périphérie dans ce processus, à savoir comment est initiée la traversée de la monocouche.

Annexe A

Microrhéologie par AFM

Les expériences de mesures des propriétés mécaniques de cellules se font avec un AFM JPK Nanowizard II.

Cette annexe présente les diverses étapes nécessaires pour mesurer le module d'Young et les modules G' et G'' de substrats mous (gels de polyacrylamide et cellules). Avant toute expérience il est indispensable de calibrer la constante de raideur du levier (la théorie a été présentée en chapitre 2).

A.1 Calibrer la constante de raideur des leviers

Il existe différents types de leviers AFM : rectangulaires et triangulaires. Dans nos expériences nous utilisons le levier C (Fig. A.1 gauche) avec une pointe pyramidale à l'extrémité. Cette puce est fixée à la tête AFM grâce à un bloc de verre (Fig. A.1 droite).

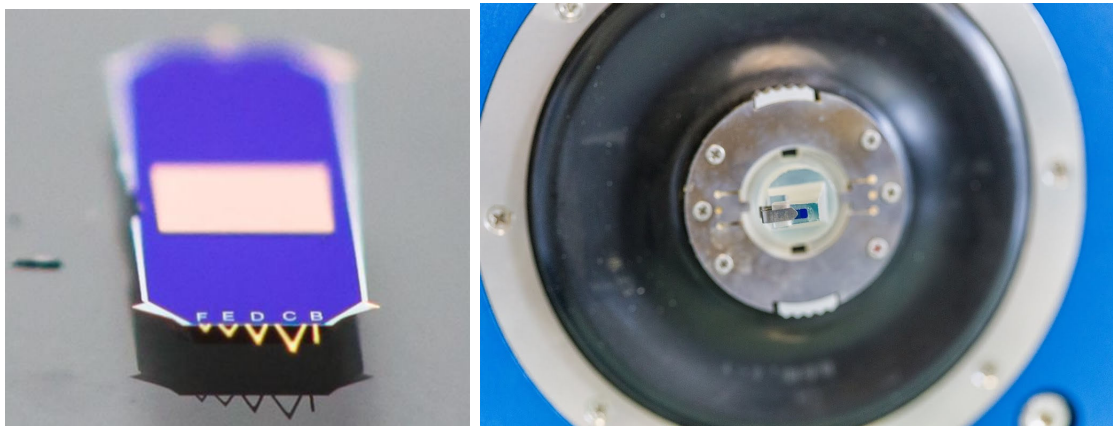


FIGURE A.1 – Gauche : Photo d'une puce avec les différentes pointes rectangulaire (B) et triangulaires (C-F). Droite : Puce fixée au bloc de verre par un ressort. Le tout est fixé à la tête AFM.

Les leviers sont calibrés avant chaque expérience. En effet, la constante de raideur $k = 0.01$ N/m est un ordre de grandeur, et pour avoir des mesures précises de force

il est essentiel de calibrer chaque levier. Le logiciel Nanowizard JPK permet une calibration rapide de la pointe sur une surface rigide (i.e le verre).

Le logiciel détecte le déplacement du laser sur un quadrant photodiode, ainsi le déplacement est mesuré en Volts. Pour avoir accès aux forces en Newton, deux étapes sont nécessaires : la mesure de la **sensibilité** en m/V suivie de la mesure de la **constante de raideur** k en N/m.

Les étapes pour faire la calibration du levier sont les suivantes :

1. Régler le point laser sur 0 dans le quadrant photodiode (le laser est bien focalisée sur le dos du levier).
2. Approcher la pointe de la surface.
3. Quand la pointe est à la surface, effectuer un RUN pour avoir une courbe de la déflexion verticale d en fonction de la hauteur Z . Le setpoint est de 4V avec une hauteur de 15 μ m.
4. Dans "Calibration Manager", définir d'abord la sensibilité avec un ajustement linéaire. En général, $s \sim 50$ nm/V.

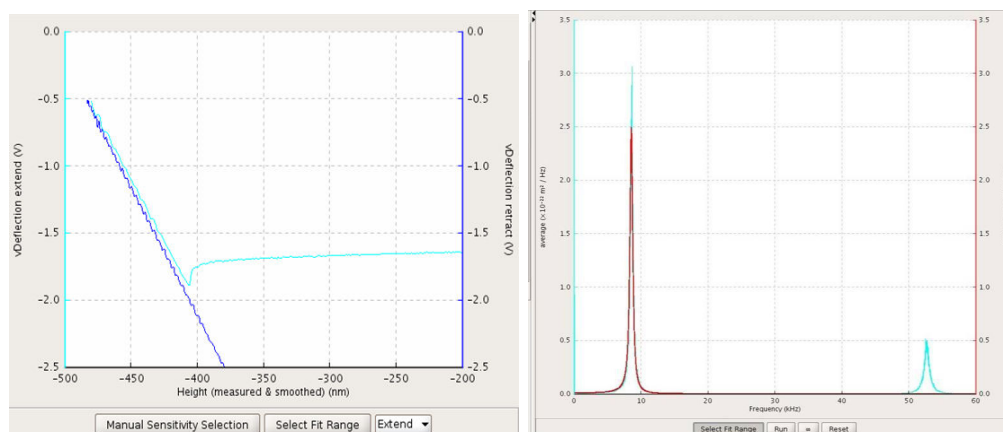


FIGURE A.2 – Gauche : Courbe de la déflexion verticale en fonction de la hauteur. L'ajustement linéaire de la courbe d'approche donne la sensibilité. Droite : Calibration de la constante de raideur par la méthode du bruit thermique.

5. Ensuite relever le levier d'environ 500 μ m de la surface et dans 'spring constant' enregistrer les fluctuations thermiques du levier. Ajuster avec l'expression de l'oscillateur harmonique (avec la correction appropriée). La théorie a été présentée au chapitre 2.

Ainsi le levier est calibré et les mesures de force sont en Newton.

A.2 Mesurer le module d'Young E

Une utilisation fréquente de l'AFM est de mesurer le module d'Young d'un matériau en ajustant une courbe de force avec le modèle théorique de contact de Hertz.

En mode contact, le levier se rapproche délicatement de la surface, l'indente jusqu'à une force, "setpoint" prédéfinie puis se rétracte. Pendant cette manipulation, les informations de hauteur Z et de déflexion verticale d du levier sont enregistrées et converties en force et indentation (Fig. A.3).

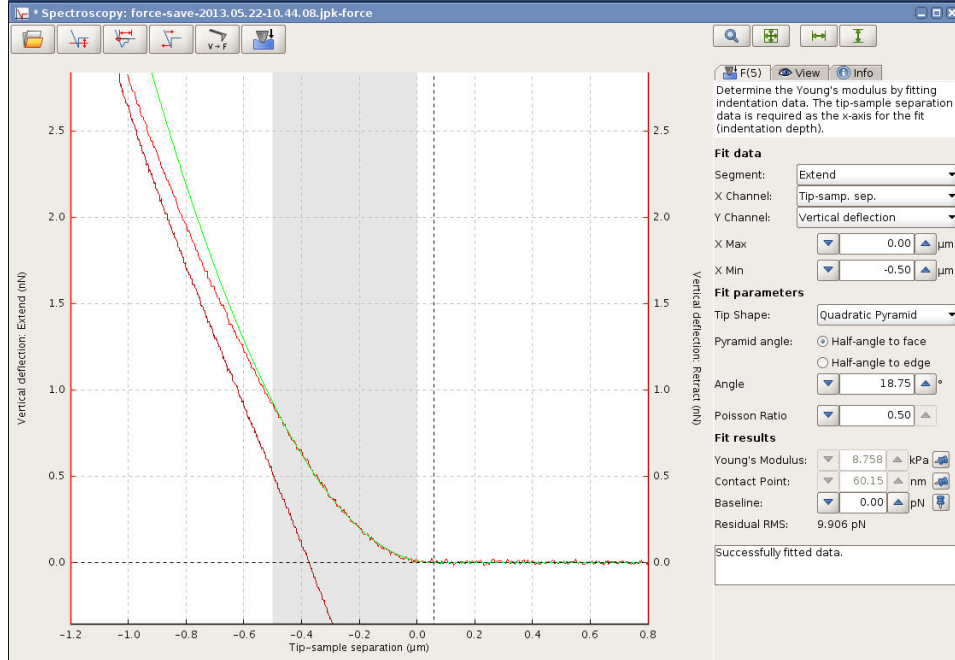


FIGURE A.3 – Courbe de force en fonction de l'indentation δ ("tip-sample separation") en mode contact obtenue par AFM avec une pointe pyramidale pour un gel de 8 kPa. Il est possible ainsi de déterminer le point de contact (quand la pointe touche la surface, la courbe de force augmente). Les courbes sont ajustées avec le modèle de Bilodeau pour une pointe pyramidale (en vert) sur 500 nm (gris).

A.3 L'indentation initiale δ_0

Une étape clé des mesures mécaniques en mode de modulation de force est la mesure de l'indentation initiale δ_0 . Cette valeur est essentielle pour tout le reste de notre étude.

Dans ce mode, le levier rentre en contact avec le substrat et l'indente d'une certaine hauteur qui est déterminée grâce à un setpoint. La Fig. A.4 montre les données de la hauteur du levier et la déflexion en fonction du temps. Lorsque la pointe rentre en contact avec le substrat, la courbe de déflexion augmente (à t_1). Le calcul de l'indentation initiale δ_0 se fait grâce à l'expression :

$$\delta_0 = Z - d = (Z_1 - Z_2) - (d_2 - d_1) \quad (\text{A.1})$$

où Z_1 et d_1 correspondent aux hauteur et déflexion en t_1 et Z_2 et d_2 sont les hauteur et déflexion en t_2 (temps après contact). La déflexion verticale est enregistrée

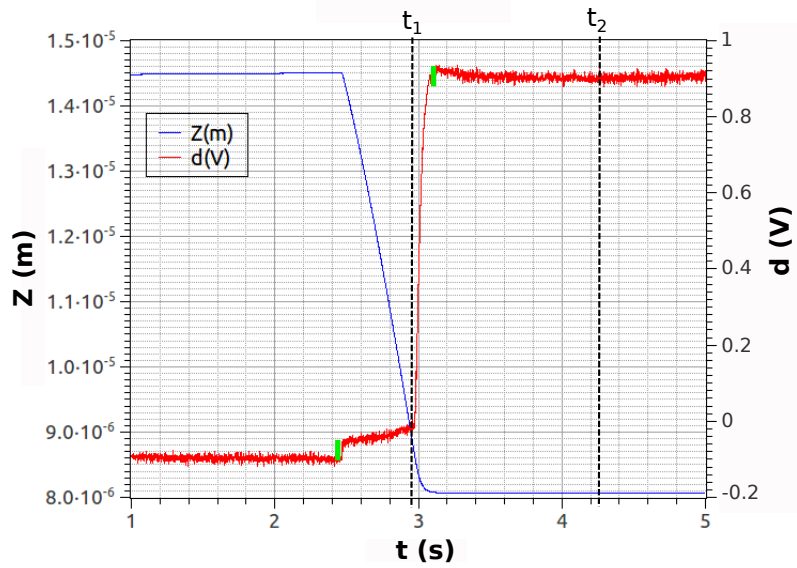


FIGURE A.4 — Courbes d’approche en mode de modulation de force : la hauteur Z (bleu) et la déflexion verticale (rouge) sont représentées en fonction du temps. Le moment de contact se trouve quand la courbe de déflexion augmente subitement. On peut ainsi en déduire l’indentation initiale δ_0 . Avant le contact, il y a un saut qui est dû à la traînée hydrodynamique (vert) puis il y a un régime transitoire.

en V et est convertie en m grâce à la sensibilité

L’indentation initiale δ_0 est déterminée via un ”setpoint” de force défini dans le logiciel. Ce setpoint est la force maximale que l’on souhaite atteindre. La variation de δ_0 en fonction du ”setpoint” a été caractérisée pour quatre gels de polyacrylamide (Fig. A.5).

δ_0 augmente de façon monotone avec le ”setpoint”. Pour une indentation initiale de 500 nm, il faut utiliser :

- un setpoint de 1 nN pour les gels de 15%
- un setpoint de 0.5 nN pour les gels 7.5% et 10%
- un setpoint inférieur à 0.3 nN pour les gels les plus mous de 5%

Pour les cellules, un setpoint de 0.5 nN est effectué au noyau, et pour le reste de la cellule, le setpoint est de 0.3 nN.

Nous pouvons ainsi précisément accéder à la valeur de l’indentation initiale.

A.4 Mode modulation de force

Une fois l’indentation initiale effectuée, une oscillation de faible amplitude est rajoutée à différentes fréquences. Pour ce, nous utilisons un script ”MicroRheology” réalisé en concertation avec les ingénieurs JPK (Fig. A.6).

Les paramètres de fréquence permettent de choisir la gamme de fréquence ainsi que le nombre de points par décade. Dans notre cas, on peut aller de 1 à 1000 Hz. L’amplitude des oscillations est aussi contrôlée à partir de ce script (environ 50 nm donc 0.1 V). On choisit aussi de rester à hauteur constante une fois l’indentation

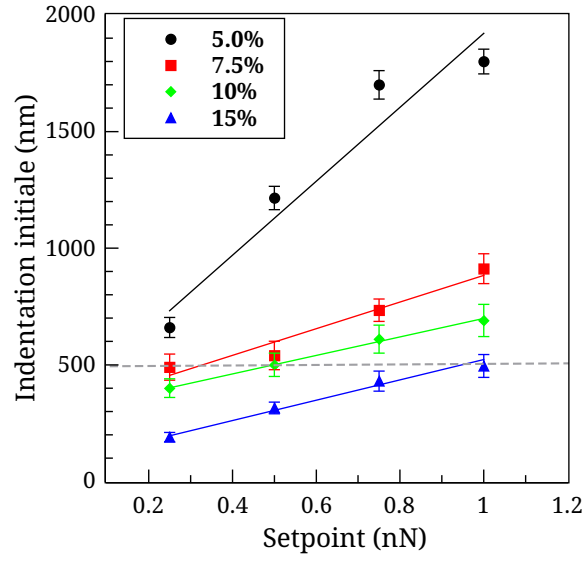


FIGURE A.5 – Indentation initiale en fonction du "setpoint" pour quatre gels de polyacrylamide (concentration en acrylamide de 5%, 7.5%, 10% et 15%). La ligne en pointillé définit $\delta_0 = 500$ nm qui est l'indentation initiale utilisée pour les mesures de G' et G'' sur gels.

initiale effectuée.

Ce script enregistre les données de hauteur et de déflexion verticale à chaque fréquence nécessaires pour le calcul de G^* (Fig. A.7)

Ces deux signaux sont convertis en force et indentation qui sont décomposés en deux quantités :

$$F(t) = \frac{F_0}{2} + \sum_{i=1}^{\infty} a_n \sin(\omega_n t) + b_n \cos(\omega_n t) \quad (\text{A.2})$$

$$\delta(t) = \frac{\delta_0}{2} + \sum_{i=1}^{\infty} c_n \sin(\omega_n t) + d_n \cos(\omega_n t) \quad (\text{A.3})$$

Ainsi on a accès à l'amplitude et la phase des signaux F et δ en utilisant les coefficients a_n , b_n , c_n et d_n :

$$F(\omega) = \sqrt{a_n^2 + b_n^2} \quad (\text{A.4})$$

$$\phi_1 = \arctan \frac{b_n}{a_n} \quad (\text{A.5})$$

$$\delta(\omega) = \sqrt{c_n^2 + d_n^2} \quad (\text{A.6})$$

$$\phi_2 = \arctan \frac{d_n}{c_n} \quad (\text{A.7})$$

La différence de phase est donc $\alpha = \phi_1 - \phi_2$. Un logiciel en matlab a été écrit

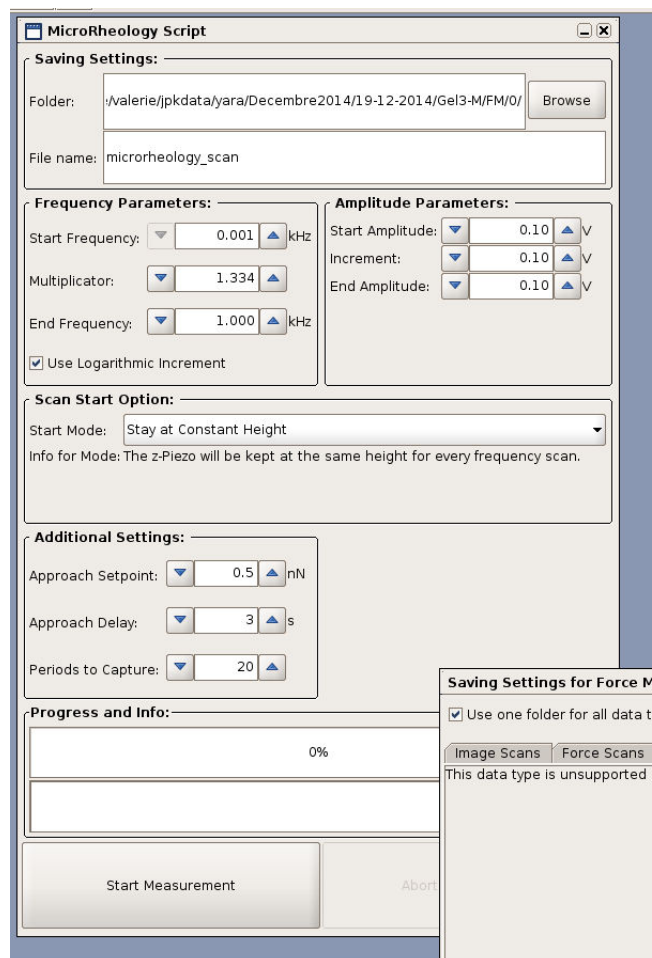


FIGURE A.6 – Script de microrhéologie inclus dans le logiciel JPK. Ce script permet de piloter la modulation des fréquences de façon automatique et rapide.

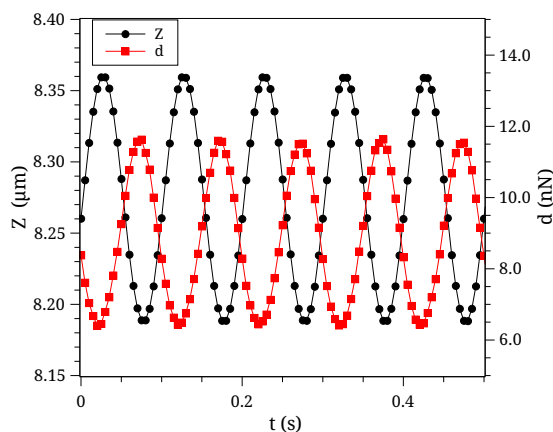


FIGURE A.7 – Courbes de Z (noir) et d (rouge) pour une fréquence de 10 Hz.

sous Matlab par Richard Michel pour analyser ces spectres après des manipulations FFT. En ne gardant que la fréquence nécessaire, on peut en déduire les modules G'

et G'' .

A.5 Mesure de la hauteur de la cellule

La mesure de la hauteur est effectuée en mode contact. Des points sont déterminés sur et en dehors de la cellule comme montré dans la Fig. A.8, et des forces sont appliquées en chaque point automatiquement.

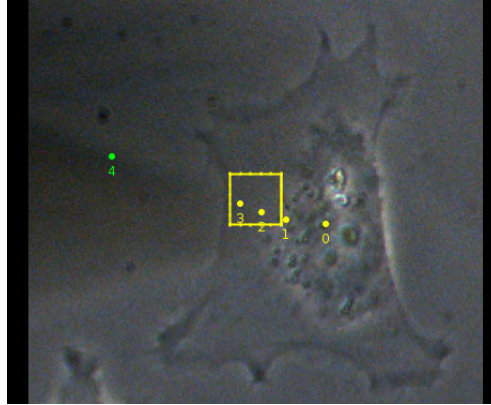


FIGURE A.8 – Détermination de la hauteur de la cellule : dans le logiciel JPK, des positions sont déterminées en (0-1-2-3) et en dehors (4) de la cellule. Une courbe de force est appliquée automatiquement à chacune de ces positions. Il est possible ainsi d'en déduire la hauteur des régions 0-1-2-3 par rapport au verre.

La comparaison des signaux en chaque position permet d'accéder à la hauteur de chaque zone. Il est possible aussi d'effectuer des topographies de la cellule en AFM (dans le cas de cellules fixées, cela demande beaucoup de temps).

Annexe B

Microscopie confocale : expérience et analyse

Protocole expérimental

La microscopie confocale est un outil novateur qui permet la détection de composant fluorescent avec une grande précision. L'actine de toutes les lignées cancéreuses que nous utilisons est marquée en GFP et il est donc possible de suivre l'évolution du cytosquelette d'actine.

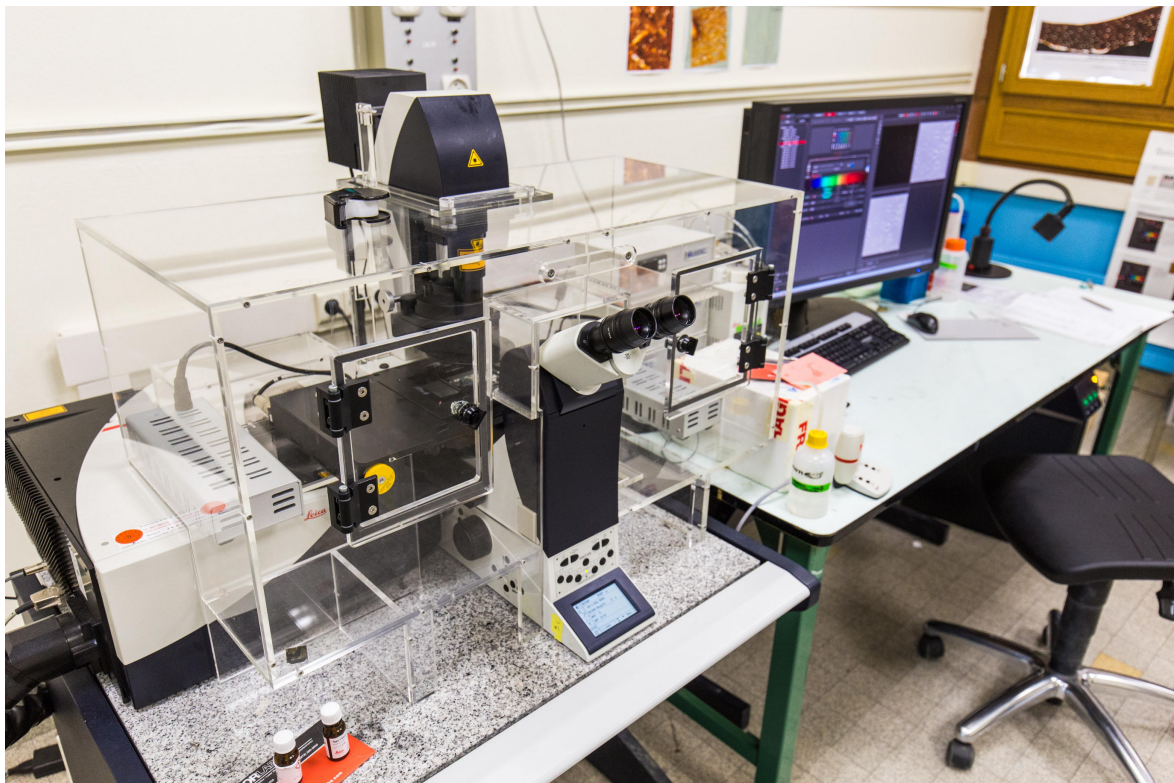


FIGURE B.1 – Microscope confocal Leica du laboratoire LIPhy.

Représentation : projection en Z avec un code couleur

La distribution d'actine en 3D est représentée par une projection en Z de la pile d'images avec un code couleur. Chaque couleur correspond à une hauteur, et ainsi il est possible de suivre les fibres d'actine d'un plan à l'autre.

1. Dans ImageJ, combiner les images (8-bit) de chaque plan en une seule pile :
Image/Stacks/Images to Stack
2. Renforcer le contraste : Image/Adjust/Brightness-Contrast
3. Faire une projection en Z avec un code couleur selon la hauteur :
Images/Hyperstacks/Temporal color code/Spectrum

Analyse : intensité de fluorescence

La projection de Z des images confocales de cellule permet de bien représenter la distribution d'actine, mais il est aussi important de quantifier cette distribution. L'idée est de séparer chaque région d'intérêt de la cellule et d'en déduire une **intensité moyenne de fluorescence (F.I)**. Pour cela nous utilisons un logiciel bien adapté : ImageJ. Cette méthode a été mis en point en collaboration avec Alexei Grichine, ingénieur de recherche à l'Institut Albert Bonniot de Grenoble.

1. Faire des sous piles d'images (sub-stack) à partir de la pile d'origine. Chaque sous-pile correspond ainsi à l'état du cytosquelette dans différentes régions de la cellule.
2. Faire une projection en Z de chaque sous-pile avec l'intensité maximale (Fig. B.2).

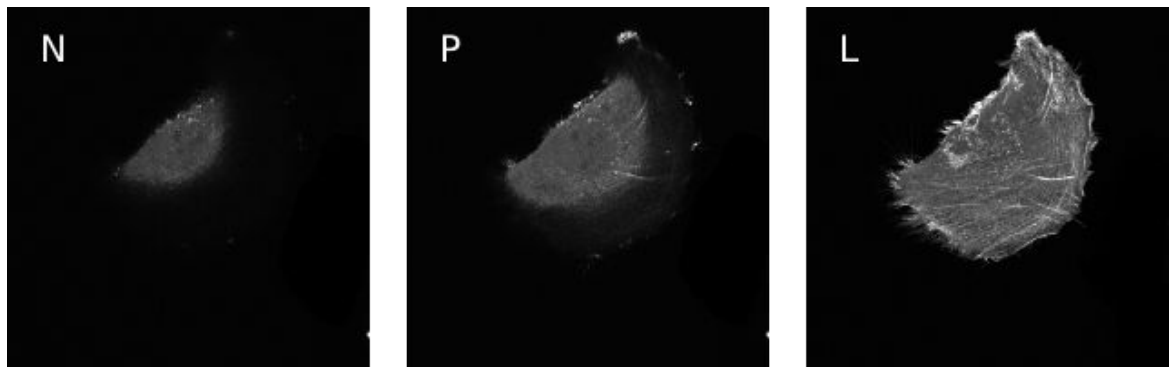


FIGURE B.2 – Analyse des images confocales avec ImageJ : projection en Z de chaque sous-pile correspondant au noyau (N), au périnoyau (P) et à la périphérie (L).

3. Pour avoir le contour des cellules, il faut binariser l'image :
Image/Adjust/Threshold/Auto/Apply
Lisser les trous : Process/Binary/Fill Holes
Lisser les contours : Process/Binary/Erode+Dilate successivement



FIGURE B.3 – Analyse des images confocales avec ImageJ : binarisation de chaque sous-pile correspondant au noyau (N), au périnoyau (P) et à la périphérie (L).

Ainsi on obtient une image binaire des trois régions (Fig. B.3).

4. Tracer le contour de chaque région avec l'outil 'baguette'
 Enregistrer la sélection dans le Manager : Edit/Selection/Add to Manager
 Utiliser le module XOR pour dessiner un contour qui ne prend pas en compte les autres régions (Fig. B.4).

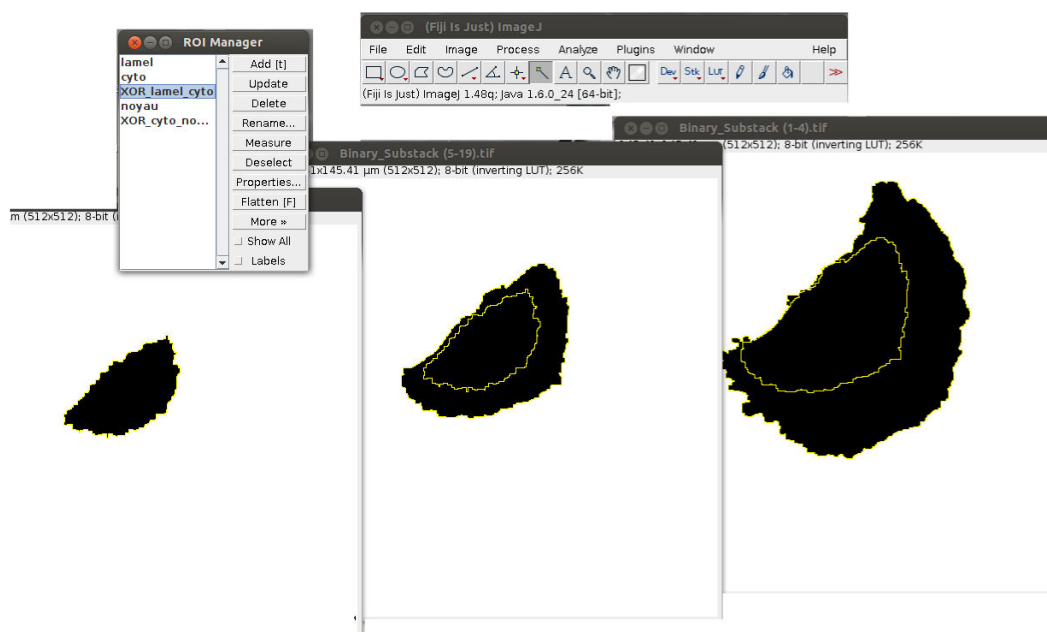


FIGURE B.4 – Analyse des images confocales avec ImageJ : contour de chaque région correspondant au noyau (N), au périnoyau (P) et à la périphérie (L).

5. Mesurer le niveau de gris moyen dans la région de notre choix : Analyze/Measure
 La valeur moyenne des niveaux de gris représente la valeur moyenne des sommes de gris de tous les pixel divisée par le nombre total de pixels dans une surface donnée. C'est ce que nous appelons **l'intensité de fluorescence (F.I)**.

Annexe C

Fabrication des gels de polyacrylamide

Cette annexe présente le protocole de fabrication des gels de polyacrylamide utilisés pour les mesures de propriétés mécaniques de cellules sur gels. Ce protocole est basé sur le procédé de fabrication de [Grevesse et al. \(2013\)](#).

Les gels sont d'une hauteur de 70 μm environ. La rigidité des gels est contrôlée en modifiant la concentration en bis-acrylamide.

Préparation des lamelles

Le gel de polyacrylamide est polymérisé entre deux lamelles fonctionnalisées de façon à ce que la lamelle inférieure adhère au gel et la lamelle supérieure puisse être retirée facilement sans l'endommager.

Toutes les expériences AFM sont effectuées dans des boîtes TPP avec une base en verre préalablement fonctionnalisée (Fig. [C.1](#)) :

1. Trouer une boîte TPP d'un diamètre de 35 mm environ.
2. Nettoyer des lamelles de diamètre 30 mm avec de l'éthanol et de l'eau déionisée
3. Passer les lamelles 3 min au plasma cleaner
4. Fonctionnaliser les lamelles avec du 3-(Triméthoxysilyl)propylacrylate (475149 - 25 mL, Sigma) pendant 1h. Cette étape permettra l'adhésion du gel au verre.
5. Après 1 heure, nettoyer avec de l'éthanol, de l'eau et sécher avec du gaz N_2 .
6. Déposer une couche de colle spéciale N-68¹ sur l'arrière de la boîte TPP. Veillez à ne pas en mettre à l'intérieur.
7. Déposer la lamelle séchée et appuyer légèrement
8. Passer aux UVs pendant environ 15min (laisser reposer 5 min à température ambiante)

1. Cette colle est à garder à 4°C et à changer tous les 3 mois.

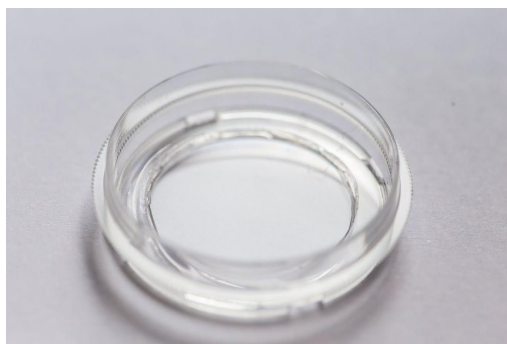


FIGURE C.1 – Image d’une boîte TPP avec une base en verre

Un autre point important dans la préparation des gels est la fonctionnalisation de la lamelle supérieure (15 mm x 15 mm) :

9. Bien nettoyer les lamelles supérieures carrées (15 mm x 15 mm) avec de l’éthanol et de l’eau déionisée
10. Fonctionnaliser avec du Sigmacote (SL2 - 100 mL, Sigma) pendant au moins 1 h.
11. Rincer avec de l’eau et bien sécher.

Préparation des gels de polyacrylamide

Les gels de polyacrylamide sont préparés avec deux solutions d’acrylamide et une solution de bis-acrylamide :

- 40% d’acrylamide : dissoudre 20 g d’acrylamide dans 50 ml d’Hepes (50mM, pH 7.4) à 37°C jusqu’à avoir une solution bien claire. La solution peut être préservée trois mois à 4°C.
- 2% de bis-acrylamide : dissoudre 1 g de bis-acrylamide dans 50 ml d’Hepes (50mM, pH 7.4) à 37°C jusqu’à avoir une solution bien claire. La solution peut être préservée trois mois à 4°C.
- 5.85% de N-hydroxyethylacrylamide² : dissoudre 65 mg de N-HEA (de densité 1.111 g/ml) dans 1 ml d’Hepes (50mM, pH 7.4) à température ambiante. Cette solution doit être fraîchement préparée le jour de l’expérience.

Le protocole pour la préparation des gels est délicat et chaque étape doit être réalisée avec soin :

1. Mélanger les solutions d’acrylamide, N-HEA et de bis-acrylamide avec les volumes appropriés en fonction de la rigidité souhaitée (cf table C.1). Ne pas utiliser le vortex.

2. Référence du N-HEA : 697931 - 100 mL (Sigma)

2. Dégazer la solution pendant 20 min avec une pompe à vide.
3. La polymérisation du gel est initiée en rajoutant les catalyseurs : 25 μl d'APS (10%) et 2.5 μl ou 5 μl de TEMED.
4. Mélanger délicatement avec une pipette sans rajouter de bulles.
5. Déposer un volume de 16 μl de la solution sur la lamelle supérieure (15x15 μm) préalablement déposée sur un cône (Fig. C.2 gauche).
6. Rapprocher la boîte TPP doucement par le haut de la lamelle et laisser le gel s'étaler entre les deux lamelles par capillarité (Fig. C.2 droite).
7. Laisser polymériser 10 min puis rajouter de l'Hepes (pour empêcher le gel de sécher) et après 30 min, décoller délicatement la lamelle supérieure.
8. Rincer trois fois à l'eau déionisée, puis ajouter du PBS et garder à 4°C.

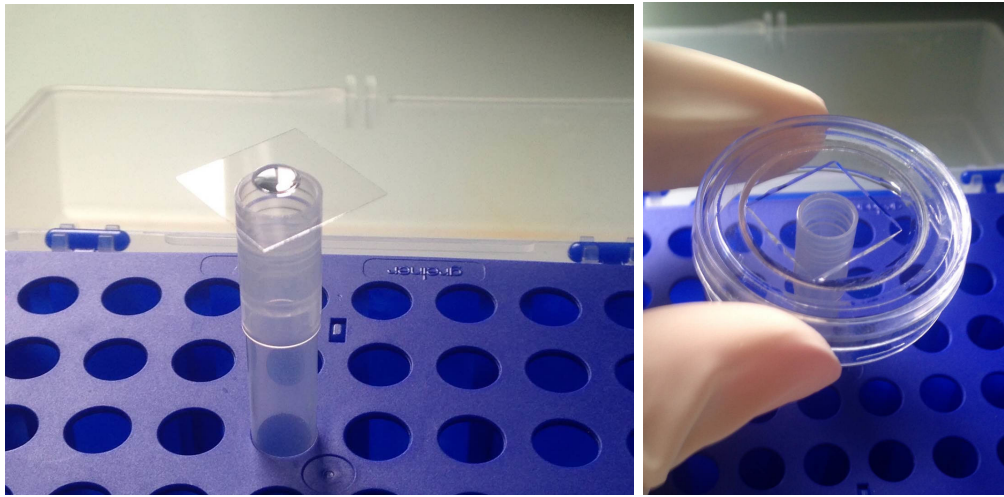


FIGURE C.2 – Gauche : Une goutte de la solution de polyacrylamide est déposée sur une lamelle 15x15 μm préalablement fonctionnalisée au sigmacote. Droite : La boîte TPP est rapprochée et le gel s'étale entre les deux lamelles par capillarité. Laisser polymériser 10 min puis rajouter de l'Hepes.

Composants	Gel 5 kPa	Gel 8 kPa	Gel 28 kPa
40 % Acrylamide	400 μl (3.2%)	400 μl (3.2%)	400 μl (3.2%)
20 % Bis-Acrylamide	750 μl (0.3%)	250 μl (0.1%)	1500 μl (0.6%)
N-HEA	1065 μl (1.25%)	1065 μl (1.25%)	1065 μl (1.25%)
50 mM Hepes	2755 μl	3255 μl	2005 μl
10% APS	25 μl	25 μl	25 μl
Temed	5 μl	5 μl	5 μl
Volume final	5000 μl	5000 μl	5000 μl

TABLE C.1 – Préparation des trois gels différents E = 5, 8, 28 kPa.

Annexe D

Publications et communications en congrès

Publications

1. **Y. Abidine**, V.M. Laurent, R. Michel, A. Duperray and C. Verdier. Microrheology of complex systems and living cells using AFM. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Eng.*, 2013, 16 :15-16.
2. **Y. Abidine**, V.M. Laurent, R. Michel, A. Duperray, L.I. Palade and C. Verdier. Physical properties of polyacrylamide gels probed by afm and rheology. *EPL (Europhysics Letters)*, 2015, 109(3) :38003.
3. **Y. Abidine**, V.M. Laurent, R. Michel, A. Duperray and C. Verdier. Local mechanical properties of bladder cancer cells measured by afm as a signature of metastatic potential. *EPJ Plus*, 2015, 130 :202.

Conférences

1. Contribution orale : **Y. Abidine**, V.M. Laurent, R. Michel, A. Duperray and C. Verdier. Microrheology of complex systems and living cells using AFM. *38ème Congrès de la Société de Biomécanique*, septembre 2013.
2. Poster : **Y. Abidine**, V.M. Laurent, R. Michel, A. Duperray and C. Verdier. Microrheology of complex systems and living cells using AFM. *5th European Cell Mechanics Meeting*, octobre 2013.
3. Contribution orale : **Y. Abidine**, V.M. Laurent, R. Michel, A. Duperray and C. Verdier. Microrheology of complex systems and living cells using AFM. *GDR 3570 Mécanique des matériaux et fluides biologiques*, juin 2014.
4. Poster : **Y. Abidine**, V.M. Laurent, R. Michel, A. Duperray and C. Verdier. Probing the local viscoelastic properties of living cancer cells using Atomic Force Microscopy. *Condensed Matter in Paris*, aout 2014

-
5. Contribution orale : **Y. Abidine**, V.M. Laurent, R. Michel, A. Duperray and C. Verdier. Microrheology of complex systems and living cells using AFM. *Le 49ème congrès du Groupe Français de Rhéologie*, octobre 2014

Physical properties of polyacrylamide gels probed by AFM and rheology

YARA ABIDINE^{1,2}, VALÉRIE M. LAURENT^{1,2}, RICHARD MICHEL^{1,2}, ALAIN DUPERRAY^{3,4}
LIVIU IULIAN PALADE⁵ ^(a) and CLAUDE VERDIER^{1,2} ^(b)

¹ *Univ. Grenoble Alpes, LIPHY, F-38000 Grenoble, France*

² *CNRS, LIPHY, F-38000 Grenoble, France*

³ *INSERM, IAB, F-38000 Grenoble, France*

⁴ *Univ. Grenoble Alpes, IAB, F-38000 Grenoble, France*

⁵ *Université Lyon, CNRS, Institut Camille Jordan, UMR 5208, INSA-Lyon, Pôle de Mathématiques, F-69621 Villeurbanne, France*

PACS 82.35.Lr – Physical properties of polymers

PACS 83.80.Kn – Physical gels and microgels

PACS 83.60.Bc – Linear viscoelasticity

Abstract. - Polymer gels have been shown to behave as viscoelastic materials but only a small amount of data is usually provided in the glass transition. In this paper, the dynamic moduli G' and G'' of polyacrylamide hydrogels are investigated using both an AFM in contact force modulation mode and a classical rheometer. The validity is shown by matching of the two techniques. Measurements are carried out on gels of increasing polymer concentration in a wide frequency range. A model based on fractional derivatives is successfully used, covering the whole frequency range. G_N^0 , the plateau modulus, as well as several other parameters are obtained at low frequencies. The model also predicts the slope a of both moduli in the glass transition, and a transition frequency f_T is introduced to separate the gel-like behavior with the glassy state. Its variation with polymer content c gives a dependence $f_T \sim c^{1.6}$, in good agreement with previous theories. Therefore the AFM data provides new information on the physics of polymer gels.

Introduction. – Polymers exhibit interesting rheological behavior for they can successively behave as liquids, elastic materials showing a rubbery plateau, then undergo a glass transition before reaching the solid domain [1]. These processes are temperature-dependent. Because of this broad range of properties, polymers are widely used in industrial applications, as well as biological processes. However, it is often difficult to characterize their material properties, as the range of relevant frequencies covers several decades [2,3]. Techniques such as classical rheometry, diffusing-wave spectroscopy (DWS) [4], dynamic light scattering [5] or ultrasonic experiments have been used to describe the complex behavior of polymers each in its own range of frequencies [6,7]. In particular, an important way to extend the linear viscoelastic behavior (LVE) is to use the time-temperature superposition principle, wherein re-

sults obtained at various temperatures are shifted onto a reference temperature master curve [3]. These observations have motivated quite a lot of theoretical studies. Different models providing relaxation spectra have been proposed, ranging from multiple Maxwell models to continuous relaxation spectra [2], involving both liquid and glassy modes. The concept of soft glassy rheology [8,9] appeared recently and provides another alternative suited for many systems. Indeed it is based on the idea that sub-elements in the microstructure are linked via weak interactions, in a disordered metastable state. Based on this concept, many complex fluids can be described thanks to this model, in particular packed colloidal suspensions, the cell cytoskeleton [10] as well as foams or slurries.

Due to their cross-linked network, polymer gels share similar properties [8] with polymers. They can be characterized using microrheology techniques [11,12], as applied in particular for actin networks [13,14]. The behavior of

^(a)E-Mail: Liviu-Iulian.Palade@insa-lyon.fr

^(b)E-Mail: Claude.Verdier@ujf-grenoble.fr

classical gels is in fact similar in the glass transition domain, but no modelling attempt has been made so far to characterize the entire frequency domain covered by recent instruments. Therefore, it is worthy to characterize various polymeric gels in a wide range of frequencies, and develop a model for the whole range. This is the main purpose of the work presented here. An AFM-based microrheology method [15–18] will be designed to investigate a wider range of frequencies, in combination with classical rheometry. This dynamic AFM technique, used to characterize [19] and probe the mechanical properties locally [16], was developed and validated up to 10 Hz for polymers [15]. Here, we will extend it up to 500 Hz by checking the overlap of the AFM and rheology data. We will choose to characterize polyacrylamide hydrogels due to their widely used mechanical properties [20, 21], in particular in biology. These gels exhibit viscoelastic properties [21], depending on concentration or cross-linking density.

A theoretical model based on a continuous relaxation spectrum modified using fractional derivatives for the higher frequencies [3] will be used to describe the whole rheology spectrum. In the classical rheology domain [0.001 Hz – 2 Hz], information on the plateau modulus G_N^0 [22] will show an increase with a power dependence with acrylamide concentration. Other model parameters will be also discussed. Further data in the high frequency range [1 Hz – 500 Hz] will allow to investigate the glass transition regime (slope a of dynamic moduli) using AFM-microrheology. In particular, a new transition time λ_T between the gel-like region and the glass regime will be introduced and compared to previous theories [23, 24].

Experiments and modelling. –

AFM and rheology measurements. Polyacrylamide gels were synthesized by mixing acrylamide (30% w/w) at four different weight concentrations (5 – 7.5 – 10 – 15%), and N,N-methylene-bisacrylamide 1% w/w at a fixed concentration 0.03% in deionized water. This means that hydrogels were slightly crosslinked. Polymerization was then initiated by incorporating N,N,N,N-tetramethylethylenediamine (TEMED, Sigma) and ammonium persulfate 10% solution (APS), as described earlier [20]. Gels of thickness 70 μm were prepared on a pre-treated glass Petri dish for a better adhesion [20]. Gels were always kept in humid conditions, so that they were swollen and in equilibrium. The Petri dish containing the gel was set onto the AFM (JPK Instruments, Berlin) equipped with an inverted microscope (Zeiss, model D1, Berlin). The AFM chips (Bruker, MLCT, pyramid shape) had 4 sharp sides with an average tip half-angle $\theta = 20^\circ$. The radius of curvature at the tip was around 20 nm. Stiffness constants used were ~ 0.01 N/m when mounted onto the AFM glass block and were calibrated using the thermal fluctuations method. Then an initial indentation δ_0 of the sample was made under a controlled force F_0 , given by Hertz model:

$$F_0 = \frac{3E \tan \theta}{4(1 - \nu^2)} \delta_0^2 \quad (1)$$

where E is the Young modulus, ν the Poisson ratio (usually assumed to be close to 0.5 for such gels [25]) and θ as defined above. It has been shown [26] that the effect of the tip curvature does not affect measurements as long as the penetration depth δ_0 is large, usually higher than 300 nm. Therefore δ_0 was chosen large enough (usually around 500 nm) allowing a sufficient contact area. In order to carry out microrheology measurements, a small perturbation $\delta(\omega)$ (frequency f from 1 Hz to 0.5 kHz, and $\omega = 2\pi f$ is the angular frequency) was superposed to the initial indentation. The perturbation being small, Eq. (1) can be linearized about the equilibrium. By the correspondence principle of LVE, in the ω -domain, one operates with complex quantities. Let δ^* , F^* be the complex indentation and force. Subtracting the hydrodynamic drag $i\omega b(0)$ [16], the complex shear modulus $G^*(\omega)$ is given by:

$$G^*(\omega) = \frac{1 - \nu}{3\delta_0 \tan \theta} \left\{ \frac{F^*(\omega)}{\delta^*(\omega)} - i\omega b(0) \right\} \quad (2)$$

where $b(h)$ is a function accounting for the geometry of the tip and depends on the height h from tip to sample, and was measured [16] by extrapolation of the function at $h = 0$. Checking of the data was also carried out using other MLCT cantilevers on the same chip, and the same results were obtained (data not shown). Frequencies were varied from 1 Hz to 500 Hz, and signals corresponding to $\delta(\omega)$ and $F(\omega)$ were recorded, showing that 500 Hz is the upper frequency limit, beyond which spurious effects occur as we get close to the resonant frequency of the cantilever.

As it is possible that inhomogeneous structures appear within such polymer networks (depending on concentration and crosslinker), AFM experiments were repeated several times. At least 16 experiments per gel were made in the frequency range. Further indentation tests were also carried out to obtain the Young modulus (E) from Eq. (1). Histograms of E , G' and G'' (at 1 Hz) are shown (10% concentration gel) in Fig. 1. The data show that heterogeneities do not affect the rheological measurements so much, and confirms that $E \sim 3G'$ (at low frequencies), as expected for incompressible elastic materials ($\nu \sim 0.5$).

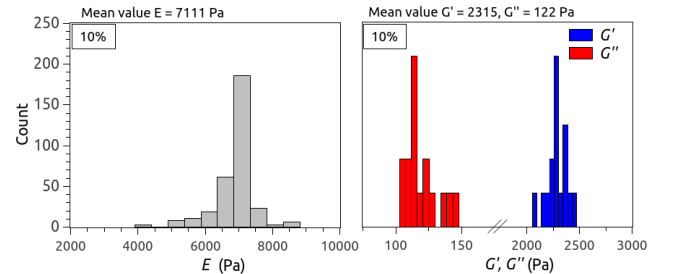


Fig. 1: Histograms showing the 10% gel rheological properties: elastic modulus (E) and dynamic moduli G' and G'' at 1 Hz. $E = 7111 \text{ Pa} \pm 34 \text{ Pa}$, $G'(1\text{Hz}) = 2315 \text{ Pa} \pm 25 \text{ Pa}$. Note that $E \sim 3G'$.

Rheometry measurements were carried out on a controlled stress rheometer (Malvern, Gemini 150) at low fre-

quencies [0.001 Hz–2 Hz] in the linear regime (deformation of 1%), and possible slip was avoided. Interestingly, an excellent agreement was found between these measurements and AFM microrheology experiments for all gels, as seen in Fig. 2 where matching occurs around 2 Hz for the 10% gel. Note that with an adequate AFM equipment operating at lower frequencies, all data should be obtained only with the AFM. Still it is interesting here to use rheometry and match both sets of data.

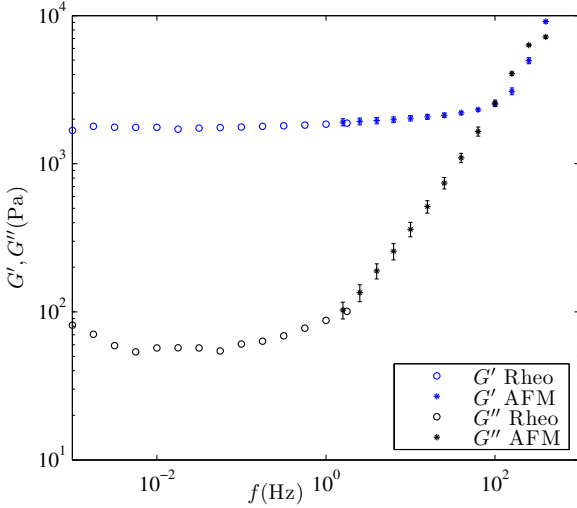


Fig. 2: Superposition of rheometrical (open circles) and AFM measurements (stars, with standard deviations shown). The acrylamide content is 10% in this case. $T = 25^\circ\text{C}$.

The variations of the dynamic moduli (Fig. 2) showed a constant elastic plateau modulus (G_N^0) at low frequencies ($G_N^0 \simeq 2300$ Pa). The gel underwent a glassy transition in the higher frequency regime as the AFM measurements did show. The slopes of both moduli G' and G'' vs. ω (slightly smaller than 1.0), were similar above 100 Hz.

Rheological modelling. To predict the observed behavior, a rheological model was used. The complex modulus $G^*(\omega)$ was related to a relaxation function $H(\lambda)$ using the formalism introduced by Winter and collaborators [2] :

$$G^*(\omega) = \int_0^\infty H(\lambda) \frac{i\omega\lambda}{1+i\omega\lambda} \frac{d\lambda}{\lambda} \quad (3)$$

$H(\lambda)$ is the continuous relaxation spectrum, the expression of which is shown in this work to model the LVE response from flow to glassy state. In particular, the flow regime was described by the function $H_f(\lambda)$, and associated complex modulus $G_f^*(\omega)$ from Eq. (3):

$$H_f(\lambda) = \begin{cases} n_f G_N^0 \left(\frac{\lambda}{\lambda_{\max}} \right)^{n_f} & \text{if } \lambda \leq \lambda_{\max} \\ 0 & \text{if } \lambda > \lambda_{\max} \end{cases} \quad (4)$$

This power law behavior can describe the continuous relaxation time distribution required to model the plateau

regime observed for G' in Fig. 2 at low frequencies, while G'' decreases with slope $-n_f$. This model is unsuitable to describe the high frequency state, and consequently the BSW description [2] is insufficient to predict the data accurately. Therefore a fractional derivative model [3] was preferred and added to the previous one, to account for high frequency data. The corresponding expression for $G_g^*(\omega)$ in the transition, was simply given by :

$$G_g^*(\omega) = G_1 \frac{(i\omega\lambda_1)^b}{1 + (i\omega\lambda_1)^a} \quad (5)$$

where a and b are the orders of fractional derivatives. Compatibility with thermodynamics [27] requires $0 < a \leq b$. This type of model accounts for the slopes in the glassy transition, as observed in the current data.

The coupling of the two linear models is insured by the simple relationship $G^*(\omega) = G_f^*(\omega) + G_g^*(\omega)$, and covers the whole frequency spectrum. The parameters of this global model are G_N^0 , λ_{\max} , n_f , a , b , G_1 and λ_1 . Fig. 3 presents the role of each parameter, in a frequency range comparable with our experiments. G_N^0 appears naturally to be the classical elastic plateau modulus (Fig. 3). λ_{\max} is the maximum relaxation time corresponding to the flow domain. In the case of gels, this specific time is out of reach since gels do not actually flow and exhibit a plateau even at very low frequencies [28]. $-n_f$ is the slope of G'' at low frequencies, in a log-log plot and is found to lie between -0.73 and -0.06 . a represents the slopes of G' and G'' in the glass transition regime (with $a = b$ in Fig. 3). G_1 is the high frequency modulus of G' , and is far above our data, so complementary rheological experiments would be necessary to reveal such high values of the limiting modulus [3]. λ_1 is a relaxation time related to the fine microstructure and is not shown in Fig. 3. Actually $1/\lambda_1$ is a typical crossover frequency between the glass and solid domains. Finally $b - a$ would correspond to the limiting slopes of G' and G'' moduli at the highest frequencies, not shown in Fig. 3. We found that $a = b$ leads to the optimal fit.

Fitting of the data was carried out for the four gels described above, characterized both in rheometry and AFM microrheology. The best-fitting values of the parameters were determined by minimizing a weighted sum of squared residuals. The weights were chosen from the data. Minimization was achieved using the Levenberg–Marquardt method. The initial guesses followed the discussion on the role of each single parameter (see Fig. 3).

The best-fitting values of the parameters are reported in Table 1 and the associated curves are presented in Figures 4–7. Very good agreement between the predictions and the model were obtained.

Discussion. – Let us look at the behavior of the plateau modulus G_N^0 , which increases with c , the acrylamide concentration. G_N^0 is shown in log-log scale in Fig. 8. A power law dependence $G_N^0 \sim c^{3.0 \pm 0.3}$ is found from the data. This exponent can be compared to other values from the literature. Indeed, previous observations

Table 1: Best-fitting values of parameters used in the model for the different gels of concentrations 5%, 7.5%, 10% and 15%.

Gel	G_N^0 (Pa)	λ_{\max} (s)	n_f	λ_1 (s)	G_1 (Pa)	$a = b$
5%	336	1.5×10^4	0.73	1.3×10^{-4}	1.0×10^4	0.82
7.5%	710	2.0×10^5	0.18	2.4×10^{-4}	1.0×10^4	0.85
10%	2307	9.0×10^9	0.08	2.4×10^{-4}	2.0×10^4	0.97
15%	8801	1.0×10^{10}	0.06	2.0×10^{-4}	5.9×10^4	0.98

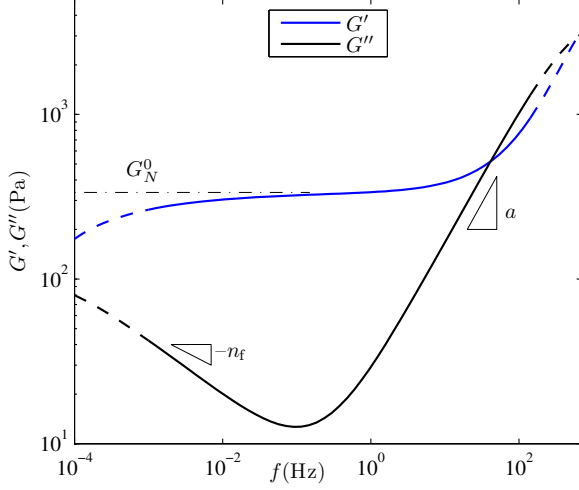


Fig. 3: Significance of the model parameters: G_N^0 (plateau modulus), n_f (slope of G'' at low frequencies), and $a = b$ (slopes of G' and G'' at high frequencies). $\omega \sim 1/\lambda_{\max}$ corresponds to the intersection of G' and G'' occurring for very low frequencies (not shown). G_1 corresponds to a higher plateau modulus in G' for $\omega \sim 1/\lambda_1$, but is well above our data.

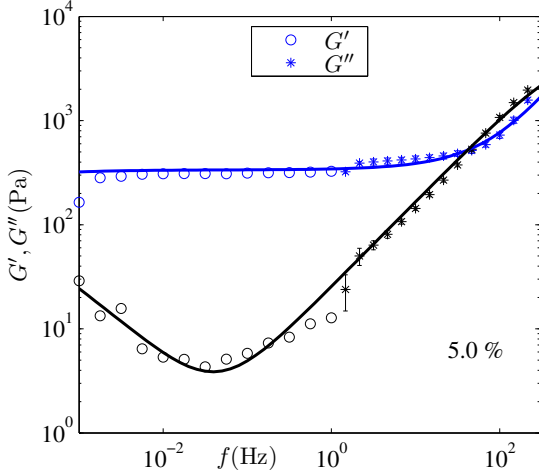


Fig. 4: Rheology of the 5% acrylamide gel. Rheometrical (open circles) and AFM (stars, with standard deviations shown) experimental data. Solid lines are the best model fits.

using combined light scattering and mechanical tests [22] report an exponent 2.55 using dynamic mechanical mea-

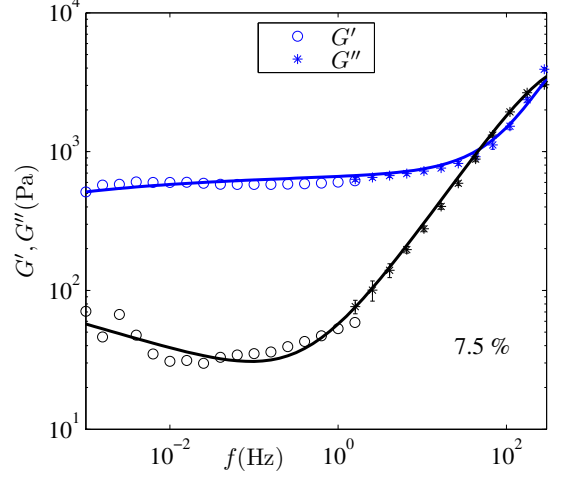


Fig. 5: Rheology of the 7.5% acrylamide gel. Rheometrical (open circles) and AFM (stars, with standard deviations shown) experimental data. Solid lines are the best model fits.

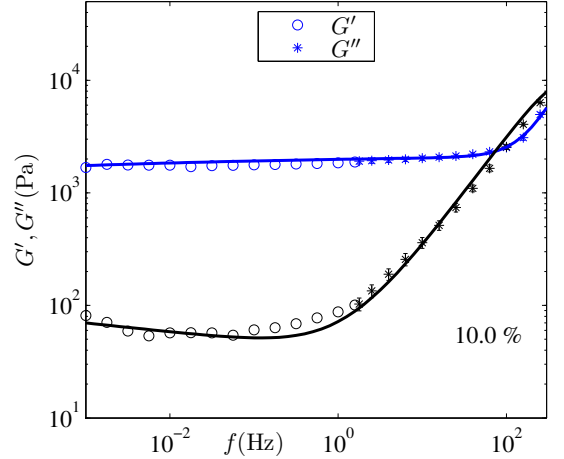


Fig. 6: Rheology of the 10% acrylamide gel. Rheometrical (open circles) and AFM (stars, with standard deviations shown) experimental data. Solid lines are the best model fits.

surements (or 2.35 using dynamic light scattering) as compared to the theory of de Gennes giving 2.25 for good solvents [23]. The exponent for G_N^0 is close to the exponent 2.55, found for collagen gels [29, 30] but larger than 1.4, obtained for entangled actin solutions [31].

The longest relaxation time λ_{\max} does not seem to play

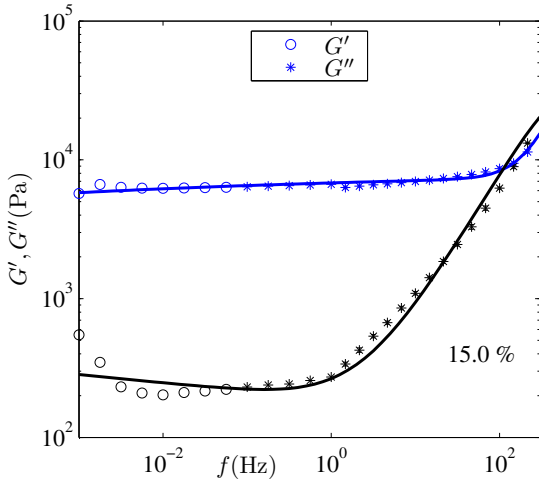


Fig. 7: Rheology of the 15% acrylamide gel. Rheometrical (open circles) and AFM (stars, with standard deviations shown) experimental data. Solid lines are the best model fits.

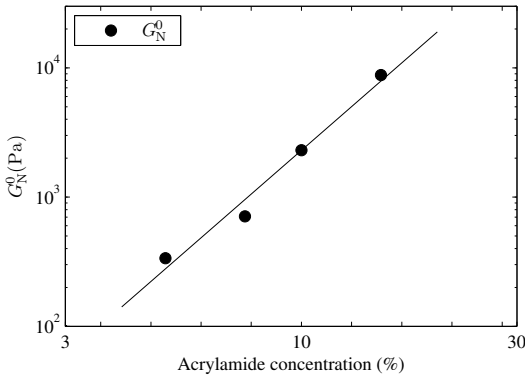


Fig. 8: Evolution of gel modulus G_N^0 vs. concentration. The slope of the power law exponent corresponds to 3.0 ± 0.3 .

a significant role, as it is related to a possible crossover of the G' and G'' moduli at low frequencies which does not occur for such gels (in our frequency range) since they do not flow at low frequencies. However, $-n_f$, the low-frequency slope of G'' vs. ω , is a parameter of interest, and becomes closer to 0, as gel concentration increases. This emphasizes the fact that high concentration gels exhibit moduli with almost flat G' and G'' moduli (see gels in Figures 6–7 at 10% and 15% acrylamide concentration). Note that values of G' and G'' at low frequencies (0.001 Hz) using classical rheometry were difficult to obtain, due to the long experimental times required, therefore a larger uncertainty is unavoidable for n_f . Nevertheless, n_f increases as c decreases, meaning that a lower crosslinking could eventually lead to a crossing of G' and G'' at lower frequencies.

At higher frequencies, G' and G'' vs. f exhibit slopes a and b between 0.82 and 0.98 (see Table 1). In all cases, the optimum was found for $a = b$, and used in the optimisation method. Both G' and G'' exhibit a slope a , related to the fractional derivatives in the model. The dependence of

$G', G'' \sim \omega^{3/4}$ suggested in the literature for semiflexible polymers [32] is therefore close to our data.

λ_1 was found to be almost constant $\sim 2.0 \times 10^{-4} s$, within experimental error, revealing no clear difference in the entanglement relaxational processes of the polyacrylamide gels at very high frequencies. Therefore, all four networks show similar trends at high frequencies.

Finally, the onset of the glass transition can be linked to the crossing of the G' and G'' moduli, at a typical frequency f_T . Above this crossing frequency, both moduli increase with a similar power dependence $G' \sim \omega^a$ and $G'' \sim \omega^a$, up to 500 Hz. This frequency is associated to a transition time $\lambda_T = 1/2\pi f_T$. As can be seen in Figures 4–7, when c increases, G' exhibits a longer plateau, and the crossing frequency f_T increases between 40 Hz and 190 Hz. It is therefore a signature of the gel. This frequency f_T can be found by inspection of G' . On the plateau, $G' \sim G_N^0$, then for higher frequencies, using Eq.(5) and $a = b$, we find $G' \sim G_1 \cos(\pi a/2)(\omega \lambda_1)^a$ since $\omega \lambda_1 < 1$ in this domain. Therefore the transition frequency f_T reads:

$$f_T = \frac{1}{2\pi \lambda_1} \left(\frac{G_N^0}{G_1 \cos(\pi a/2)} \right)^{1/a} \quad (6)$$

The increase of f_T with c is confirmed by inspection of Table 1. $\frac{G_N^0}{G_1}$ increases with c , since G_N^0 varies faster than G_1 with c , while $\cos(\pi a/2)$ decreases, thus the ratio $\frac{G_N^0}{G_1 \cos(\pi a/2)}$ increases and $1/a$ increases with c as well. Since λ_1 is almost constant, we deduce that f_T increases with polymer concentration. f_T can be understood as an important parameter characterizing the transition from a polymer gel to a system where single-chains may fluctuate between crosslinks. In this respect, it has been shown that polymeric systems undergo transitions, in the context of the Rouse model [23] or considering hydrodynamic interactions [24]. These processes involve a correlation length ξ , i.e. a characteristic length scale which estimates the fluctuations and is usually measured by elastic and light scattering measurements. The correlation length ξ usually varies like $\xi \sim c^{-0.75}$ [23], as verified experimentally for polyacrylamide gels [33]. The theoretical frequency f_T possibly varies as $f_T \sim c^{2.75}$ [23] or $c^{2.25}$ [24] for entangled polymeric networks. In the context of gels, these features may show differences and have not yet been tested. Our measurements provide accurate data on the crossing of G' and G'' , thanks to AFM measurements. As the bisacrylamide concentration is small, one can expect the correlation length to be rather constant, on the order of 10 nm as shown previously [34], thus ξ and f_T will depend mainly on polymer concentration c . A careful analysis of the data in Fig. 9 shows a power behavior $f_T \sim c^{1.6 \pm 0.1}$. This exponent is slightly below the exponent predicted previously [24]. Nevertheless, the change in f_T was captured, as an important network parameter – sensitive to concentration c – accessible from such measurements. Thus, our AFM-technique, coupled with classical rheology, brings together important information on the dynamics of such gels.

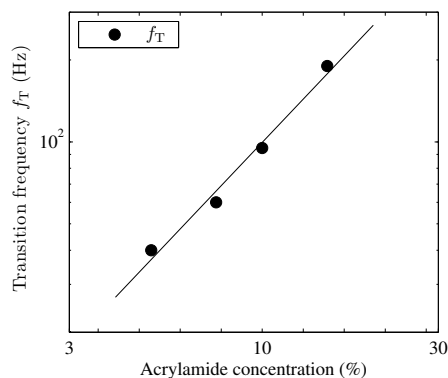


Fig. 9: Evolution of transition frequency f_T vs. concentration. The power law exponent is 1.6 ± 0.1 .

Conclusions. — In this paper, we showed the ability of the AFM-based microrheology technique to extend classical rheological properties of gels. Both methods were used and matched on the elastic plateau, with higher frequency data obtained thanks to the AFM technique.

A model was proposed to predict the experimental data. It includes a multiple relaxation spectrum at low frequencies combined with a fractional model for higher frequencies. The model parameters are related to the gels physical properties. In particular, a new characteristic frequency f_T has been introduced at the onset of the glass transition and was compared to previous theories.

Further applications of the model may be considered with other physical (or chemical) gels, as well as the study of biological systems, such as actin, tubulin networks, and finally living cells [16]. Indeed, this model, coupled with the use of high frequency AFM measurements, may allow to investigate more complex materials and provide simple parameters to distinguish them.

Acknowledgments. — We thank the ANR for grant n° 12-BS09-020-01 (TRANSMIG), the Nanoscience foundation for support of the AFM platform. The LIPhy laboratory is part of the LabeX Tec21 (Investissements d’Avenir—grant agreement— n° ANR-11-LABX-0030). Special thanks go to E. Geissler for fruitful discussions.

REFERENCES

- [1] LARSON R., *The Structure and Rheology of Complex Fluids* (Oxford University Press, New York) 1999.
- [2] BAUMGAERTEL M., ROSA M. E. D., MACHADO J., MASSE M. and WINTER H. H., *Rheol. Acta*, **31** (1992) 75.
- [3] PALADE L. I., VERNEY V. and ATTANÉ P., *Rheol. Acta*, **35** (1996) 265.
- [4] GITTES F., SCHNURR B., OLMSTED P. D., MACKINTOSH F. C. and SCHMIDT C. F., *Phys. Rev. Lett.*, **79** (1997) 3286.
- [5] DASGUPTA B. R. and WEITZ D. A., *Phys. Rev. E*, **71** (2005) 021504.
- [6] VERDIER C., LONGIN P. Y. and PIAU M., *Rheol. Acta*, **37** (1998) 234.
- [7] LONGIN P. Y., VERDIER C. and PIAU M., *J. Non-Newt. Fluid Mech.*, **76** (1998) 213.
- [8] SOLLICH P., LEQUEUX F., HÉBRAUD P. and CATES M. E., *Phys. Rev. Lett.*, **78** (1997) 2020.
- [9] SOLLICH P., *Phys. Rev. E*, **58** (1998) 738.
- [10] FABRY B., MAKSYM G. N., BUTLER J. P., GLOGAUER M., NAVAJAS D. and FREDBERG J. J., *Phys. Rev. Lett.*, **87** (2001) 148102.
- [11] MASON T. G., GANESAN K., VAN ZANTEN J. H., WIRTZ D. and KUO S. C., *Phys. Rev. Lett.*, **79** (1997) 3282.
- [12] CROCKER J. C., VALENTINE M. T., WEEKS E. R., GISLER T., KAPLAN P. D., YODH A. G. and WEITZ D. A., *Phys. Rev. Lett.*, **85** (2000) 888.
- [13] CHAUDHURI O., PAREKH S. H. and FLETCHER D. A., *Nature*, **445** (2007) 295.
- [14] DALHAIMER P., DISCHER D. E. and LUBENSKY T. C., *Nat. Physics*, **3** (2007) 354.
- [15] MCGUIGGAN P. and YARUSSO D., *J. Mat. Research*, **19** (2004) 387.
- [16] ALCARAZ J., BUSCEMI L., GRABULOSA M., TREPAT X., FABRY B., FARR R. and NAVAJAS D., *Biophys. J.*, **84** (2003) 2071.
- [17] HIRATSUKA S., MIZUTANI Y., TSUCHIYA M., KAWAHARA K., TOKUMOTO H. and OKAJIMA T., *Ultramicroscopy*, **109** (2009) 937.
- [18] ABIDINE Y., LAURENT V. M., MICHEL R., DUPERRAY A. and VERDIER C., *Comput. Methods Biomech. Biomed. Eng*, **16** (2013) 15.
- [19] RADMACHER M., TILLMANN R. W. and GAUB H. E., *Biophys. J.*, **64** (1993) 735.
- [20] PELHAM R. J. and WANG Y., *Mol. Biol. Cell*, **10** (1999) 935.
- [21] AMBROSI D., DUPERRAY A., PESCHETOLA V. and VERDIER C., *J. Math. Biol.*, **58** (2009) 163.
- [22] HECHT A.-M. and GEISSLER E., *J. Physique*, **39** (1978) 631.
- [23] DE GENNES P.-G., *Macromolecules*, **9** (1976) 587.
- [24] DE GENNES P.-G., *Macromolecules*, **9** (1976) 594.
- [25] BOUDOU T., OHAYON J., PICART C. and TRACQUI P., *Biorheology*, **43** (2006) 721.
- [26] RICO F., ROCA-CUSACHS P., GAVARA N., FARR R., ROTGER M. and NAVAJAS D., *Phys. Rev. E*, **72** (2005) 021914.
- [27] BAGLEY R. L. and TORVIK P. J., *J. Rheol.*, **27** (1983) 201.
- [28] VERDIER C., ETIENNE J., DUPERRAY A. and PREZIOSI L., *C. R. Acad. Sci. Phys.*, **10** (2009) 790.
- [29] JORDAN A., DUPERRAY A., GÉRARD A., GRICHINE A. and VERDIER C., *Biorheology*, **47** (2010) 277.
- [30] VADER D., KABLA A., WEITZ D. and MAHADEVAN L., *PLoS One*, **4** (2009) e5902.
- [31] HINNER B., TEMPEL M., SACKMANN E., KROY K. and FREY E., *Phys. Rev. Lett.*, **81** (1998) 2614.
- [32] GITTES F. and MACKINTOSH F. C., *Phys. Rev. E*, **58** (1998) R1241.
- [33] WU C., QUESADA M. A., SCHNEIDER D. K., FARINATO R., STUDIER F. W. and CHU B., *Electrophoresis*, **17** (1996) 1103.
- [34] ORAKDOGEN N. and OKAY O., *Polymer Bulletin*, **57** (2006) 631.

Local mechanical properties of bladder cancer cells measured by AFM as a signature of metastatic potential^{*}

Y. Abidine^{1,2,a}, V.M. Laurent^{1,2}, R. Michel^{1,2}, A. Duperray^{3,4}, and C. Verdier^{1,2,b}

¹ Univ. Grenoble Alpes, LIPHY, F-38000 Grenoble, France

² CNRS, LIPHY, F-38000 Grenoble, France

³ INSERM, IAB, F-38000 Grenoble, France

⁴ Univ. Grenoble Alpes, IAB, F-38000 Grenoble, France

Received: 15 June 2015 / Revised: 15 August 2015

Published online: 13 October 2015

© The Author(s) 2015. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract. The rheological properties of bladder cancer cells of different invasivities have been investigated using a microrheological technique well adapted in the range [1–300 Hz] of interest to understand local changes in the cytoskeleton microstructure, in particular actin fibres. Drugs disrupting actin and actomyosin functions were used to study the resistance of such cancer cells. Results on a variety of cell lines were fitted with a model revealing the importance of two parameters, the elastic shear plateau modulus G_N^0 as well as the glassy transition frequency f_T . These parameters are good markers for invasiveness, with the notable exception of the cell periphery, which is stiffer for less invasive cells, and could be of importance in cancer metastasis.

1 Introduction

Cancer cell metastasis is a multi-stage process characterized by cell malfunctional behavior. Some of the major pathological characteristics of cancer cells are their particular mechanical properties, and their ability to invade surrounding tissues, transmigrate and proliferate at new sites. A critical step in cancer is the conversion from non-tumorigenic cell to metastatic cell, and it is not yet understood how this change occurs. However, there are evidences that cancer progression is characterized by disruption and reorganization of the actin cytoskeleton [1] as well as changes in the mechanical properties [2]. This change is probably associated with the enhanced capability of cancer cells to migrate and adapt to changing environments.

The mechanical properties of cells are essentially determined by the cytoskeleton microstructure [3–5] which is remodeled during cell migration, adhesion, proliferation and differentiation. They are essential for the regulation of cell functions. Several studies of a variety of diseases using different experimental techniques have shown that abnormalities are connected with the mechanical properties of cells, in particular in cancer metastasis [6,7]. In fact, this is a subject of controversy as some studies report a stiffening of cancer cells compared to benign cells [8], while others show that cancer is characterized by the decrease of the cell stiffness [9,10] *i.e.* metastatic cancer cells have an elastic modulus lower than that of healthy cells. It has also been suggested that variations of dynamical properties taking place during tumour invasion provide a signature of malignancy [11].

The determination of mechanical properties of single cells has become possible with the development of local measurement techniques such as magnetic twisting cytometry [12], laser tracking microrheology [13], two-point microrheology [14] or the atomic force microscope (AFM) [15,16]. Some researchers [9] investigated the elastic response of normal and human bladder cancer cells using the AFM. They found that cancer cells exhibit a Young modulus lower than normal cells. This softening of cancer cells has also been observed with other techniques such as the optical stretcher [17]. AFM has proved to be a reliable tool to probe the load-displacement relationship of soft materials at small scale with high resolution. It is especially valuable to characterize static and frequency-dependent mechanical

^{*} Contribution to the Focus Point on “The Physics of Cancer” edited by M. Ben Amar.

^a e-mail: yara.abidine@gmail.com

^b e-mail: claud.verdier@ujf-grenoble.fr

properties of biological specimens. Thus, AFM is becoming one of the most popular tools to measure cell mechanical properties [18–20].

The cytoskeleton, comprised of actin filaments, intermediate filaments and microtubules is a key element for regulating these mechanical properties. In particular, the active forces generated by the actin cytoskeleton can modify or even control them [21]. Their effect on self-organization and material properties has been studied extensively [22, 23] as mechanical measurements can be obtained together with the analysis of intracellular movement [24]. Disrupting the actin network results in a softening of cells [25–27]. Indeed, the acto-myosin contractility is essential for the production of cellular tensions. Inhibiting these major functions is often used to characterize the relationship between actin microstructure and mechanical properties. In particular, actin polymerization drives cancer cell motility [28]. A way to inhibit the actin polymerization is to use Latrunculin A, a powerful drug that binds to the G-actin monomers and prevents them from polymerizing with the actin fibres [29]. The ability of cancer cells to migrate requires force generation to overcome factors that oppose movement. F-actin assembles with myosin II filaments to form a protein complex that uses energy from the ATP hydrolysis to power actin-myosin contraction [30]. Y27632 is a drug inhibiting the Rho-kinase complex which is essential for contractility. It will also induce a relaxation of the cytoskeleton [31].

In this study, we report on the viscoelastic properties of human bladder cancer cells by dynamic indentation experiments using AFM. We investigate the complex shear modulus of three different cell lines with different metastatic potential. We probe the elastic and viscous moduli at three different locations across the cell: nucleus, perinucleus and the cell periphery. With the use of actin inhibitory drugs, we correlate mechanical properties and the actin microstructure obtained by confocal microscopy imaging. We propose a simplified multi power-law model to describe the behavior of the elastic and viscous moduli. We also report a relationship between the malignancy of cancer cells and their viscoelastic properties. In particular, we find that the elastic plateau modulus and the transition frequency (frequency at which $G' = G''$) can be used as markers of invasiveness.

2 Measurements of the local viscoelasticity using AFM

2.1 Experimental setup

Experiments were carried out using a Nanowizard II AFM (JPK Instruments, Berlin, Germany) mounted on a Zeiss microscope (Observer D1, Carl Zeiss, Jena, Germany). All measurements were carried out in Force Modulation Mode at 37 °C using the Petri Dish Heater (JPK Instruments, Berlin, Germany). We used a triangular silicon nitride cantilever with a four-sided pyramidal tip (MLCT, Bruker, lever C) with a nominal spring constant $k = 0.01 \text{ N m}^{-1}$ calibrated using the thermal noise method. Sharp tips are better suited to reach a higher spatial resolution. We keep the applied force lower than 3 nN to remain in the linear elastic regime where the Hertz model can be used. When the cantilever tip gets into contact with the sample, the force acting on the cantilever increases to a previously chosen setpoint (F_0), corresponding to an initial indentation δ_0 . The relationship is given by Sneddon's modification of the Hertzian contact mechanics model [32]:

$$F_0 = \frac{3 E \tan \theta}{4 (1 - \nu^2)} \delta_0^2, \quad (1)$$

where E is the cell's Young modulus, ν its Poisson ratio ($\nu \sim 0.5$) and $\theta = 20^\circ$ is the half pyramid angle. δ_0 is chosen so that the tip penetration depth into the sample is large enough to have a sufficient contact area and not too large to remain within the linear elasticity regime. In order to carry out microrheology measurements, a small perturbation $\delta(\omega)$ (frequency f from 1 Hz to 300 Hz, and $\omega = 2\pi f$ is the angular frequency) was superposed to the initial indentation. During this procedure the tip remained in contact with the cell. We impose the indentation $\delta(\omega)$ and we measure the force response $F(\omega)$, as previously described [33]. The perturbation being small, eq. (1) can be linearized around the equilibrium. By the correspondence principle of linear viscoelasticity (LVE), in the ω -domain, one operates with complex quantities, the indentation δ^* and the force F^* , and the hydrodynamic drag $i\omega b(0)$ is subtracted [16]. The drag coefficient $b(0)$ is estimated from the extrapolation of the fit $b(h)$ as a function of the tip-sample separation h to $h = 0$. Then using the relationship $G^* = E^*/(2(1 + \nu))$, the complex shear modulus $G^*(\omega)$ becomes:

$$G^*(\omega) = \frac{1 - \nu}{3 \delta_0 \tan \theta} \left\{ \frac{F^*(\omega)}{\delta^*(\omega)} - i\omega b(0) \right\}. \quad (2)$$

From this relationship one can extract the real part (elastic modulus G') and imaginary one (loss modulus G'').

Cells were cultured on a glass substrate so there may be a possible influence of the substrate on thin cell regions. This is known as the “bottom effect” artefact that makes cell appear stiffer than they really are when thin samples are used. To avoid this artefact, usually the indentation is limited to 10% of the cell thickness [10]. In our study, we want to compare the local viscoelasticity of human bladder cancer cells, especially at the periphery, where the cell thickness is around 200 nm. Thus, it is necessary to correct for substrate effects in AFM indentation measurements.

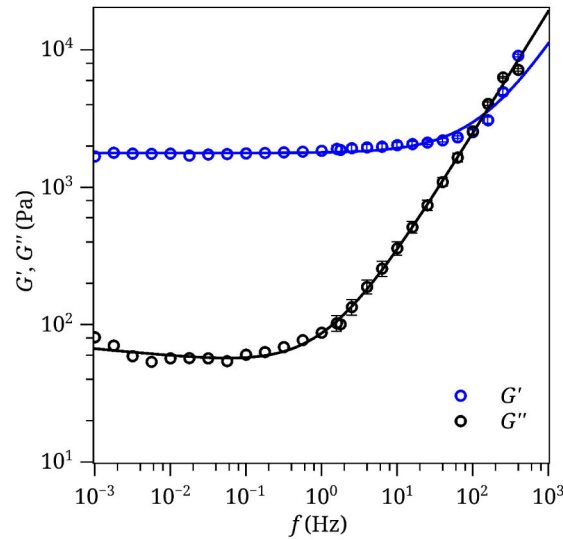


Fig. 1. Rheology of the 10% acrylamide gel: rheometrical and AFM experimental data are shown. Solid lines are the best model fit. Error bars represent SEM.

The effect of the substrate on thin films using spherical tips has been investigated previously [34,18]. Recently, new results were given [35] to investigate indentation of thin soft films using sharp conical indenters using finite element modeling. They propose a correction function $g_B(\chi_0)$ with $\chi_0 = (\delta_0 \tan \theta)/h$ including finite thickness effects and the load-displacement (F - δ_0) curves for conical indenters can be described by $F = F_{\text{Hertz}}(\delta_0) g_B(\chi_0)$, where $F_{\text{Hertz}}(\delta_0)$ is given by the usual Hertz model for conical tips, similar to eq. (1) expect for the leading coefficient ($2/\pi$ instead of $3/4$). This correction function was readily generalized into the frequency domain by linearizing with respect to $\delta(\omega)$, and the resulting complex shear modulus G_c^* probed by a pyramidal tip is given by

$$G_c^*(\omega) = \frac{1-\nu}{3 \tan \theta \delta_0} \frac{F^*(\omega)}{\delta^*(\omega)} g(\chi_0)^{-1}. \quad (3)$$

The correction function is estimated by

$$g(\chi_0) = 1 + 0.945 \chi_0 + 1.447 \chi_0^2 + 3.108 \chi_0^3 - 1.0668 \chi_0^4. \quad (4)$$

With this correction of the substrate effect on thin layers, we can probe the complex shear modulus locally in all cell regions.

2.2 Rheological model

This method was tested on polyacrylamide gels in previous work [33]. In the latter paper, a fractional derivative model was used to model the viscoelastic behavior of the gels in a wide frequency range. The model can be simplified here to account for the reduced frequency domain and the possible different slopes [36,37], thus the gel or the cell elastic and viscous moduli can be modelled as

$$G'(\omega) = G_N^0 + k_1 \omega^a \quad (5)$$

$$G''(\omega) = k_0 \omega^{-n_f} + b k_1 \omega^a, \quad (6)$$

where G_N^0 is the classical elastic plateau modulus at low frequencies, $-n_f$ the slope of G'' at low frequencies in log-log plot, a the exponent of the slope of G' and G'' in the glass transition regime, b a parameter describing the ratio G''/G' at high frequencies, whereas k_0 and k_1 are two other fitting parameters.

Figure 1 shows the G' and G'' moduli of a polyacrylamide gel (10% concentration) measured with a classical rheometer (f from 10^{-3} Hz to 3 Hz) and by AFM in force modulation mode (f from 1 Hz to 300 Hz). Fitting was achieved using the model eqs. (5)-(6) with parameters summarized in table 1 below.

A typical transition frequency f_T corresponding to the crossing of G' and G'' ($G' = G''$) can also be deduced. Above this frequency, G' and G'' increase with a similar slope a . In our previous paper [33], we identified this frequency

Table 1. Best-fitting values of parameters used in the model for the polyacrylamide gel.

$G_N^0(\text{Pa})$	n_f	$k_0(\text{Pa} \cdot \text{s})$	$k_1(\text{Pa} \cdot \text{s})$	a	b	$f_T(\text{Hz})$
1773	0.05	51	3.8	0.89	2.0	158

as a signature of the polyacrylamide gel. In the domain of high frequencies with $b > 1$, the transition frequency f_T can be approximated by

$$f_T = \frac{1}{2\pi} \left(\frac{G_N^0}{(b-1)k_1} \right)^{1/a}. \quad (7)$$

The model (5)-(6) is quite successful for describing gel rheology, therefore it will serve as a basis for modelling of cell rheology, as discussed in the next part.

3 Materials and methods

Bladder cancer cells and culture

Three bladder cancer cell lines, representing different malignancy states of metastasis progression, were used, RT112, T24 and J82 (ATCC, Rockville, MD). RT112 cancer cells are moderately differentiated while T24 and J82 cancer cells are poorly differentiated and have a higher malignancy potential.

Cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum and 1% penicillin streptomycin. One day before measurements, cells were seeded at a density of 3×10^4 cells per well on glass coverslips coated with $25 \mu\text{g/mL}$ fibronectin overnight at 37°C in humidified 5% CO_2 atmosphere. Such cells are considered to be in a low migrating state since the fibronectin concentration is quite high [38]. AFM measurements were carried out on isolated cells at 37°C . Three independent preparations were made for each cell line. Cancer cell lines were transfected with the LifeAct plasmid expressing actin-GFP (Green Fluorescent Protein - pEGFP).

Inhibition of the actin functions

In order to verify how the actin cytoskeleton influences the viscoelastic properties, T24 cells were treated with two inhibitory drugs. For inhibition of the F-actin polymerization, cells were treated with $1 \mu\text{M}$ Latrunculin A (Sigma-Aldrich) and a Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor Y27632 ($20 \mu\text{M}$, Sigma-Aldrich) was used to inhibit the actomyosin contractility. Measurements were done before and after treatment. Once the first measurements of G' and G'' were made, the medium was removed and a new medium containing the drug was added at the desired concentration. Measurements were then carried out every 10 min. In this study we report only the measurements at $t = 0$ and $t = 20$ min. It is shown that the effect of the treatment is stable over 30 min and reversibility was verified.

Confocal measurements

Confocal microscopy was used separately to determine the microstructure of the actin cytoskeleton before and after inhibition of the actin polymerization and acto-myosin contractility. Confocal image stacks (Z-stacks) were acquired with a Leica TCS SP8 using Argon laser (488 nm) and a 40x immersion objective.

To quantify the distribution of the actin fibres in the cell, the mean fluorescence intensity of three regions of the cell (nucleus, perinucleus and periphery) was analyzed using the ImageJ software¹. Regions of interest were defined by dividing the entire z-stack of confocal images into three sub-stacks where the mean fluorescence intensity is then calculated.

Statistical analysis

Data were analyzed by a two-sample unpaired Student's t-test. Values correspond to $p < 0.001$ ***, $p < 0.01$ **, $p < 0.05$ (*) and $p > 0.05$ (n.s.). Values were considered statistically significant when $p < 0.01$.

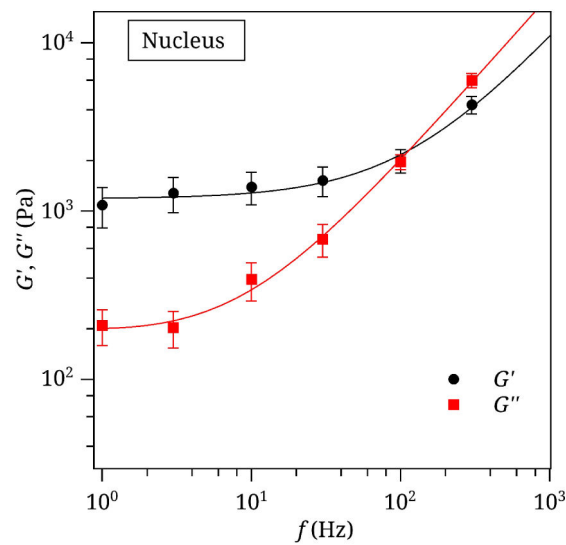


Fig. 2. Evolution of moduli G' and G'' in a region above the nucleus of individual T24 cells ($N = 20$, error bars represent SEM). Curves were fitted with eqs. (5)–(6) and parameters are discussed below.

4 Results and discussion

4.1 Bladder cancer cell T24 and spatial dependency

Viscoelastic properties were probed on T24 cancer cells locally, at three different locations across the cell: nucleus (N), perinucleus (P) and the edge of the cell (E). For viability reasons, measurements were carried out at 6 frequencies only: $f = 1, 3, 10, 30, 100, 300$ Hz. Let us first concentrate on one location, as shown in fig. 2 representing the elastic G' and viscous moduli G'' as a function of frequency, measured above the nucleus.

The complex shear modulus follows the typical frequency dependence found for other cells such as neutrophils, airway smooth muscle cells and other cancer cells measured using different microrheological methods [39,40]. G' exhibits a plateau at low frequencies until 20 Hz and then increases with frequency following a power law with exponent $a \simeq 0.8$. The viscous modulus G'' is smaller than the elastic modulus G' in the low frequency regime and increases with frequency until G'' dominates in the high-frequency domain.

An attempt to explain the power-law behavior of the microrheology spectrum of living cells has been made before [16]. By describing the cell as a soft glassy material [41], some rheological features can be assigned to the cytoskeletal organization and remodelling. A few authors [11,16] measured the viscoelastic properties of cells using this model to explain their rheological data. A common parameter is the slope (~ 0.2) of G' and G'' , at low frequencies, but a higher slope of 1 is found for G'' at higher frequencies, attributed to a viscous component. In our case, several regimes corresponding to different slopes coexist suggesting that the underlying processes that govern the rheology of cancer cells are not time-scale invariant. Thus it is not possible to describe the whole frequency domain with the SGR model. Explanations have been proposed in other works [36,37]. In these papers, it appears that the frequency dependent behavior can be explained by alternative mechanisms such as the collective behaviors of molecular non-covalent interactions of proteins.

Next, measurements were made at different cell locations, as shown in fig. 3. Data was obtained by indenting on top of the nucleus, perinucleus and periphery (the cell edge). Confocal microscopy images were made and positions of the indentations are shown, together with a height map of the actin microstructure.

Similar results are obtained for the three locations but the moduli increase as moving towards the edge (N to P to E). We described our data with the simplified model and the fitting parameters of the moduli of T24 cells (G_N^0 , a and b only) are represented in fig. 4. To link the parameters with the actin network microstructure, the mean fluorescence intensity of the actin (from confocal images) in the three regions was measured and represented also in fig. 4. One can observe that the intensity is higher at the periphery. This result is in agreement with other studies showing that the periphery of the cell is enriched in actin filaments [6].

If we compare the fluorescence intensity to the mechanical properties probed at the three different locations (fig. 3 and fig. 4), we find several interesting features. First the viscoelasticity of cancer cells is position-dependent and G^* exhibits the same behavior at the three locations. However, the elastic plateau increases from the nucleus to the periphery, whereas the viscous modulus increases with frequency and becomes dominant at high frequencies. We

¹ Rasband WS. 1997. ImageJ. Bethesda, MD: U.S. National Institutes of Health.

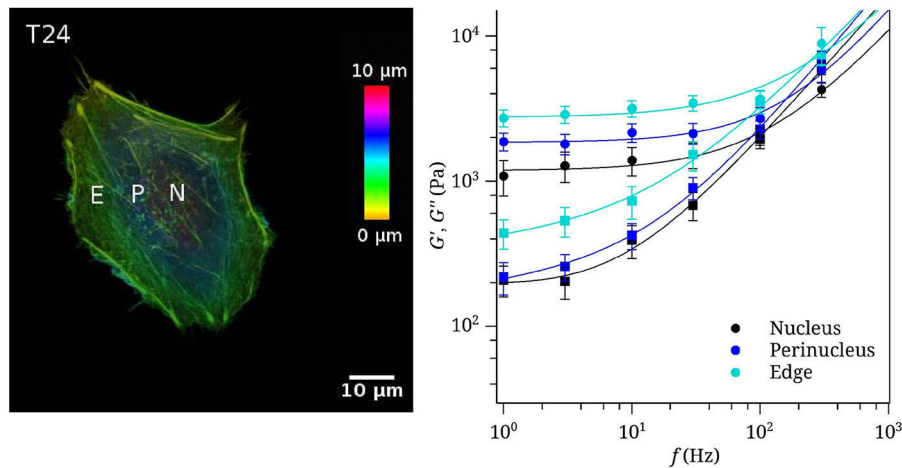


Fig. 3. Left: Confocal images of a single T24 cell. A z -projection with a color scale corresponding to the height (yellow is the basal side of the cell, and red is on top of the nucleus). Indentations are made at three locations: nucleus (N), perinucleus (P) and the edge (E). The cells are in a low migrating state. Right: Evolution of moduli G' (circle) and G'' (square) on the nucleus (black), perinucleus (blue) and edge of the cell (cyan); $N = 20$ and error bars represent SEM. Curves were fitted with the model.

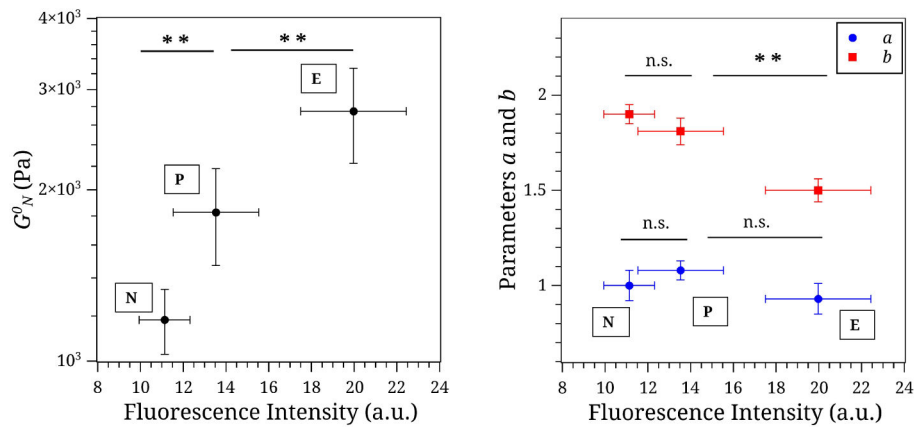


Fig. 4. Parameters G_N^0 , a and b as functions of the fluorescence intensity (arbitrary units) of T24 cells at three different locations: nucleus (N), perinucleus (P) and the edge of the cell (E); $N = 20$ and error bars represent SEM. p -values were calculated using Student's unpaired t-test: $**p < 0.01$ represents significant difference between different locations and "n.s." means $p > 0.05$ and there is no significant difference.

also observe that the gap between G' and G'' becomes more important at the periphery, suggesting the importance of elasticity due to the presence of actin fibres. Parameter b (G''/G' at high frequencies) is also a signature of an elasticity decrease as shown when plotted against fluorescence intensity. The parameter G_N^0 increases with fluorescence intensity confirming that the elasticity of the cell depends on the actin microstructure. The slope a is relatively constant across the cell suggesting that the actin microstructure is not of major importance in the glassy transition. This slope could be explained by the collective behavior of non-covalent myosin bonds [36,37,42].

The spatial heterogeneity of the viscoelastic properties has been observed by Cai *et al.* [43]. They measured G' and G'' at two different locations on fibroblast cells (center and off-center) and found that the center of the cell is stiffer. Similarly, Rigato *et al.* [44] also noted that the centre of the cell is stiffer than the periphery. These findings can be explained by the fact that they investigated confined cell properties. Indeed cells were cultured on adhesive patterns, and were not free to form bundles of fibres at the periphery. This could explain the difference in behavior.

In our case, we find that the cell periphery is stiffer than the rest of the cell and the viscous component is lower. This behavior has also been found by Rebelo *et al.* [45] who investigated the mechanical properties at three locations on cancer and normal cells: peripheral region, intermediate height and cell body. Similarly to our results, they observe differences between responses of the cell body and the periphery of the cell: the cell edge has a higher Young modulus than the cell body. They explain this behavior by the structure and morphology of the periphery of each cell line (however they do not quantify the actin distribution as we did).

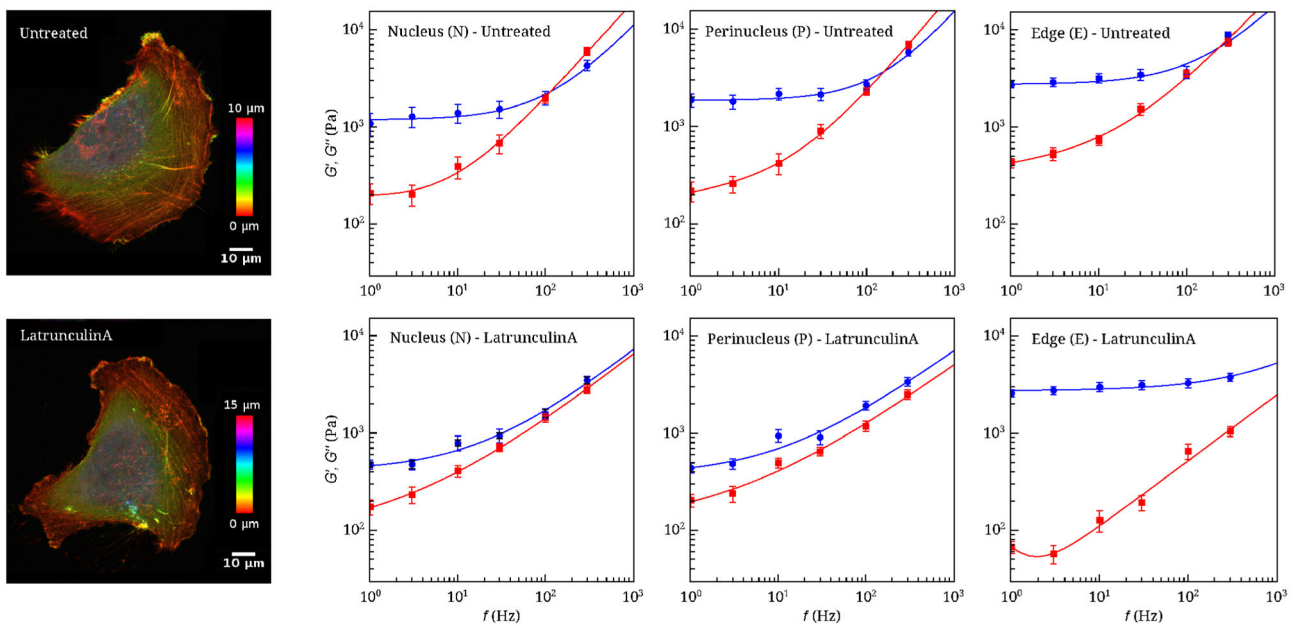


Fig. 5. Left: Confocal images of a single T24 cell before (left, above) and 20 minutes after Latrunculin A $0.1 \mu\text{M}$ treatment (left, below). A z -projection was made and colors correspond to the height (red is the basal side of the cell, and pink is on top of the nucleus). Microrheological properties are measured at three locations: nucleus (N), perinucleus (P) and the edge (E). 20 confocal images have been made and usually cells are in a low migrating state. Right: Evolution of moduli G' (blue circle) and G'' (red square) on the nucleus, perinucleus and periphery of the cell for untreated (above) and treated conditions (below), $N = 20$ and error bars represent SEM. Curves were fitted using the model (5)-(6). Parameters as well as the mean fluorescence intensity of each region are shown in fig. 6 and summarized in table 2.

Disrupting the actin network will give us more information about how the cytoskeleton microstructure influences viscoelasticity and the model parameters.

4.2 Influence of the actin network on cell mechanical properties

The viscoelastic properties of cells measured by AFM are strongly associated with the actin network [25,43] which is spatially heterogeneous and changes over time. To have a better understanding of the correlation between the actin microstructure and the mechanical properties, two major actin functions were inhibited: the actin polymerization using Latrunculin A and the acto-myosin contractility with Y27632.

Inhibiting the actin polymerization with LatrunculinA

Figure 5 shows the viscoelastic properties of T24 cells before and after treatment with Latrunculin A ($0.1 \mu\text{M}$) at three different locations. Measurements were carried out before ($t = 0$) and after treatment ($t = 20 \text{ min}$ and $t = 30 \text{ min}$). The reversibility of the treatment was verified (after the medium was rinsed, cells are stable for about 30 min and mechanical properties were recovered; data not shown). Confocal images corresponding to the two conditions (fig. 5) show that the actin filaments are indeed disrupted (for example, actin fibres that go from the bottom of the cell to the top disappear after treatment). However, there are still actin fibres at the basal side, this might be due to the low drug concentration we used (it was chosen so that the cell does not retract completely in order to perform AFM measurements).

The mean plateau modulus G_N^0 and corresponding fluorescence intensity are shown in fig. 6. The parameters deduced from the model are summarized in table 2.

We first note that G' and G'' still increase with frequency after inhibition of the actin polymerization (fig. 5). These features are consistent with those observed in previous studies [14,43,46]. However, there are some notable differences. There is no crossing of G' and G'' at the high frequencies after inhibition of the actin polymerization, so the network remains elastic. The elastic plateau G_N^0 decreases at the centre of the cell and the perinucleus. However, at the periphery of the cell, G_N^0 remains constant even though the mean fluorescence intensity decreases (fig. 6). This may be due to the fact that the Latrunculin A concentration is small in our case. Finally, at the cell periphery, there is a huge decrease of G'' after treatment, in comparison with the other two locations.

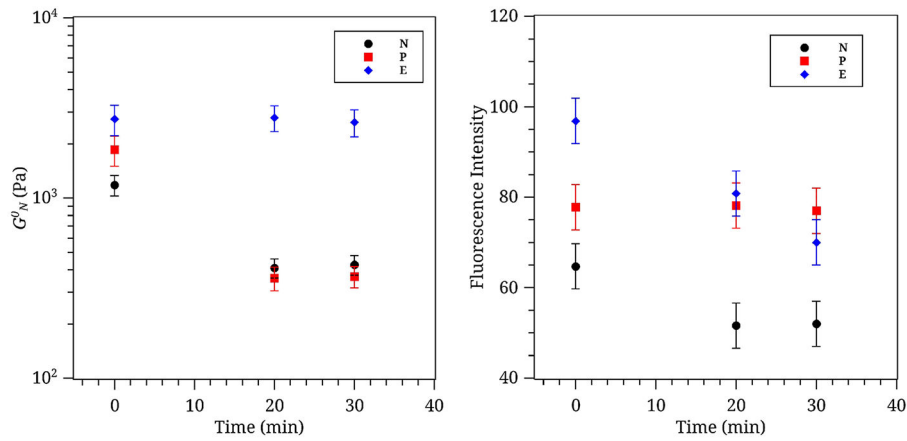


Fig. 6. G_N^0 (left) and fluorescence intensity (right) before ($t = 0$) and after treatment with Latrunculin A $0.1 \mu\text{M}$ ($t = 20$ min, $t = 30$ min). Parameters are summarized in table 2. $N = 20$ and error bars represent SEM: When G_N^0 decreases (nucleus and perinucleus) and when the fluorescence intensity decreases (nucleus and edge), the differences are significant ($p < 0.01$).

Table 2. Fluorescence intensity (FI, arbitrary unit) and best-fitting values of parameters G_N^0 , n_f , a and b used in the model (5)-(6) for T24 cells treated with Latrunculin A ($0.1 \mu\text{M}$). Here only time $t = 20$ min is shown; $N = 20$ and all values are represented as mean \pm SEM.

Cell location	Parameters	$t = 0$	$t = 20$ min
Nucleus (N)	FI (a.u.)	64 ± 14	51 ± 11
	G_N^0 (Pa)	1182 ± 154	410 ± 50
	n_f	0.08 ± 0.008	-0.12 ± 0.008
	a	1.00 ± 0.03	0.71 ± 0.02
	b	1.90 ± 0.08	0.91 ± 0.05
Perinucleus (P)	FI (a.u.)	77 ± 19	78 ± 20
	G_N^0 (Pa)	1856 ± 354	360 ± 54
	n_f	-0.113 ± 0.007	-0.07 ± 0.001
	a	1.08 ± 0.02	0.65 ± 0.02
	b	1.80 ± 0.08	0.71 ± 0.05
Edge (E)	FI (a.u.)	96 ± 35	80 ± 35
	G_N^0 (Pa)	2749 ± 524	2796 ± 454
	n_f	-0.09 ± 0.008	0.29 ± 0.008
	a	0.93 ± 0.04	0.67 ± 0.04
	b	1.50 ± 0.08	0.97 ± 0.05

All these observations suggest that the cell lamellipodium mechanics plays a specific role. The distribution of the actin cytoskeleton at the periphery is not sufficient to explain these features.

Inhibiting the actomyosin contractility with Y27632

Further investigations were carried out by inhibiting the acto-myosin contractility using Y27632. Only the model parameters are summarized in table 3.

When the acto-myosin contractility is inhibited, the cell cytoskeleton is not under tension anymore. The fluorescence intensity shows that the distribution of actin does not change. Nevertheless interesting comments can be made about the cell periphery properties, in particular G_N^0 considerably increases after treatment (table 3). The periphery becomes more rigid after inhibition. The values of n_f describe the G'' slope at low frequencies. In our case, these values are close to 0 or slightly > 0 except for few cases in particular when using Y27632 at $t = 20$ min at the cell edge. This result may be surprising, but it may be explained by the fact that Y27632 prevents the acto-myosin contractility, so

Table 3. Fluorescence Intensity (FI, a.u.) and best-fitting values of parameters G_N^0 , n_f , a and b used in the model (5)-(6) for T24 cells treated with Y27632 (20 μ M); $N = 10$ and all values are represented as mean \pm SEM.

Cell location	Parameters	$t = 0$	$t = 20$ min
Nucleus (N)	FI (a.u.)	32 ± 5	36 ± 5
	G_N^0 (Pa)	1182 ± 154	480 ± 31
	n_f	0.08 ± 0.008	-0.44 ± 0.0068
	a	1.00 ± 0.03	1.41 ± 0.02
	b	1.90 ± 0.08	1.1 ± 0.01
Perinucleus (P)	FI (a.u.)	46 ± 4	41 ± 5
	G_N^0 (Pa)	1856 ± 354	970 ± 200
	n_f	-0.113 ± 0.007	-0.18 ± 0.001
	a	1.08 ± 0.02	0.83 ± 0.05
	b	1.80 ± 0.08	0.91 ± 0.02
Edge (E)	FI (a.u.)	54 ± 8	46 ± 9
	G_N^0 (Pa)	2749 ± 524	8563 ± 500
	n_f	-0.09 ± 0.008	2.3 ± 0.008
	a	0.93 ± 0.04	0.89 ± 0.04
	b	1.50 ± 0.08	0.85 ± 0.02

the nucleus and perinucleus regions get deprived from actin fibres which diffuse towards the lamellipodium, therefore elasticity increases. Recently, Labouesse *et al.* [47] suggested that there are myosin-independent forces, related to a passive elastic component, that contribute to the tension at the periphery. These findings can be related to our results since the inhibition of acto-myosin contractility increased the elasticity at the periphery. It could also be due to the presence of another relaxation mechanism associated to longer chains activated by proteins of the Rho kinase family that are not inhibited by Y27632, like Rac and cdc42 [48].

Direct influence of the actin network on the mechanical properties has been described in various studies [14, 43, 49], however our results show that the cell periphery plays a unique role.

4.3 Mechanical properties are a marker of cancer cell invasivity.

To link invasiveness with the mechanical properties of cancer cells, we carried out dynamical experiments on three cell lines from human bladder carcinoma: RT112, T24 and J82 with increasing malignant potential, respectively. RT112 cells are less invasive than T24 and J82 [50]. Several studies have shown that the viscoelasticity of cancer cells can be a marker of their malignancy [11, 45]. Since we found a particular behavior of the mechanical properties at the periphery (*i.e.* edge) of the cell, as also observed for some migrating cells [51], it is important to characterize the mechanical properties at the periphery of cancer cells of different invasiveness. Figure 7 shows the G' - G'' curves of the three cell lines at three different positions.

In fig. 7, the elastic modulus G' decreases when malignancy increases. However, at the cell edge, G_N^0 (T24) < G_N^0 (J82) while on the nucleus it is the opposite, suggesting once again the unique properties of the cell periphery. To have a better understanding of the relationship between the actin microstructure of the three cell lines at different locations, the fluorescence intensity was linked with the parameters (table 4).

Parameter G_N^0 is plotted in fig. 8 for the three cell lines. An interesting behavior is found: for all cell lines, the elastic plateau is higher at the cell periphery, however the variations between each location are different. For example, the elastic plateau of J82 (the most invasive type) at the edge is 11 times higher than on the nucleus, whereas the ratio is 2.3 and 7 for T24 and RT112, respectively. Although the mechanical properties of bladder cancer cells seem to show interesting behaviors, they cannot be correlated with the fluorescence intensity, *i.e.* the actin microstructure. This can be due to the fact that the shape of each cell line is inherently different. Indeed, J82 cells are known to show an elongated morphology [52].

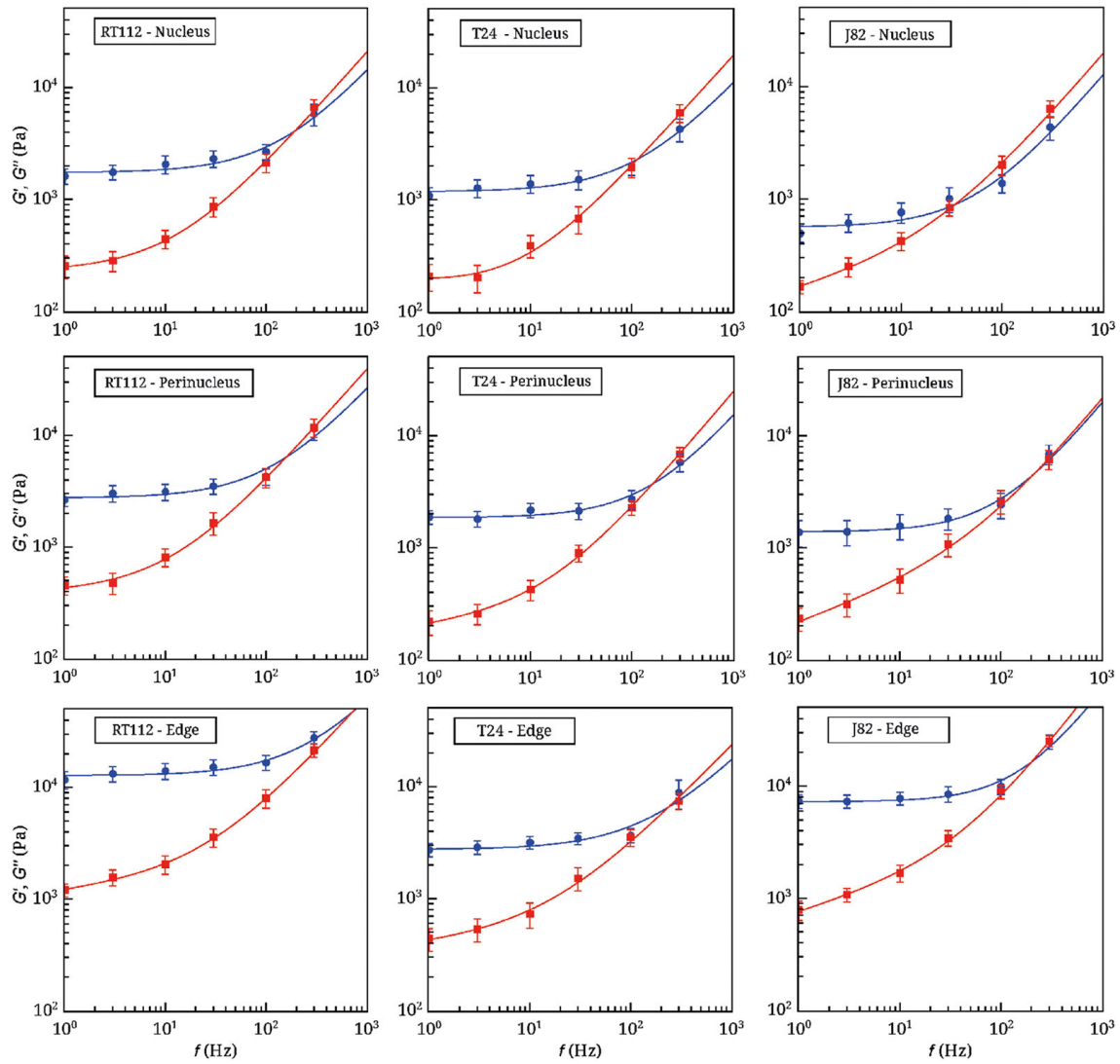


Fig. 7. Evolution of G' (blue circle) and G'' (red square) on the nucleus (N), perinucleus (P) and edge (E) —top to bottom row— of three cancer cell lines: RT112, T24 and J82 (left to right, respectively, $N = 10$, $N = 20$, $N = 10$, error bars represent SEM). Curves were fitted with the model (5)-(6); G_N^0 is plotted in fig. 8 and the other parameters are summarized in table 4.

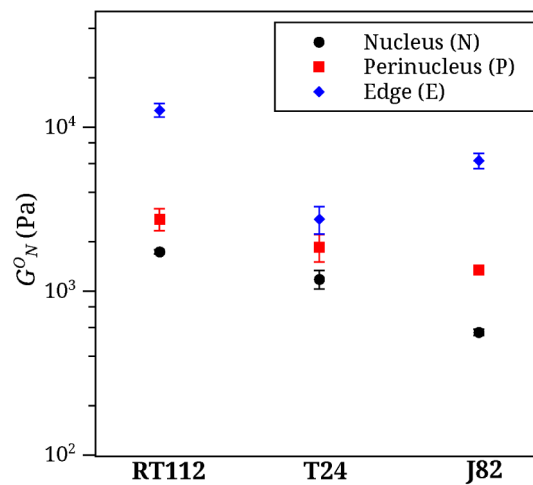


Fig. 8. Parameter G_N^0 (three cell lines: RT112, T24, J82) on nucleus (N), perinucleus (P) and cell edge (E). The other parameters are summarized in table 4. The differences between G_N^0 of all different cell lines at all locations are significant ($p < 0.01$).

Table 4. Fluorescence intensity (FI, a.u.) and the best-fitting values of parameters G_N^0 , n_f , a and b used in the model (5)-(6) for cancer cells of different invasivity RT112, T24 and J82 (respectively, $N = 10$, $N = 20$, $N = 10$, all values are represented as mean \pm SEM). The transition frequency f_T is determined experimentally.

Parameters	Cell line	Nucleus (N)	Perinucleus (P)	Cell edge (E)
FI (a.u.)	RT112	26 ± 5	20 ± 5	35 ± 5
	T24	11 ± 1.1	13.5 ± 2.0	20 ± 2.4
	J82	49.8 ± 11	61 ± 15	80 ± 20
G_N^0 (Pa)	RT112	1738 ± 54	2756 ± 102	12701 ± 1200
	T24	1182 ± 154	1856 ± 120	2749 ± 524
	J82	561 ± 24	1350 ± 45	6254 ± 652
n_f	RT112	-0.01 ± 0.006	-0.27 ± 0.005	-0.1 ± 0.005
	T24	0.08 ± 0.005	-0.113 ± 0.005	-0.09 ± 0.005
	J82	-0.255 ± 0.005	-0.3 ± 0.005	-0.26 ± 0.005
a	RT112	1.01 ± 0.05	1.01 ± 0.02	1.01 ± 0.02
	T24	1.00 ± 0.01	1.08 ± 0.02	0.93 ± 0.04
	J82	1.06 ± 0.01	1.13 ± 0.05	1.12 ± 0.06
b	RT112	1.63 ± 0.05	1.59 ± 0.05	1.3 ± 0.02
	T24	1.9 ± 0.06	1.8 ± 0.02	1.5 ± 0.04
	J82	1.55 ± 0.05	1.06 ± 0.05	1.51 ± 0.06
f_T (Hz)	RT112	226 ± 10	160 ± 15	879 ± 21
	T24	104 ± 5	170 ± 15	220 ± 5
	J82	38 ± 5	205 ± 20	194 ± 5

Another important parameter to deduce from the AFM measurements is the transition frequency f_T that corresponds to the crossing of the G' and G'' moduli (table 4, fig. 8). On the nucleus, f_T shifts to the lower frequencies as the invasivity increases (fig. 7). This is well correlated to the decrease of the plateau modulus G_N^0 . The transition frequency f_T seems to be a signature of the invasiveness on the nucleus. On the perinucleus, there is no significant difference. As for the periphery, we find that f_T decreases when invasivity increases (T24 and J82 have close malignancy potential). On the nucleus and the edge, cells with higher invasivity have a lower transition frequency. This suggests once again that the properties at the periphery are critical, and can be used as a marker of malignancy.

Several researchers have investigated the relationship between invasivity and cellular mechanics. Ramos *et al.* [20] investigated the elastic properties of non-malignant and cancerous bladder cell lines using the AFM. They found that normal cells are stiffer than cancer cells. The viscoelastic properties of different cell lines (malignant and benign) were also investigated by Rother *et al.* [11] by AFM who showed that the loss tangent (G''/G') at 100 Hz increases with the metastatic potential of cancer cells and can be used as a marker of invasivity. We have also calculated the loss tangent at 100 Hz of the three cell lines on the nucleus (data not shown) and we find similar findings. Further local measurements reported the cell edge viscoelastic properties. We found that the elastic plateau G_N^0 (obtained at low frequencies) is a marker of metastatic potential, since this parameter decreases when invasivity increases. However, on the periphery of invasive cells, $G_N^0(\text{J82}) > G_N^0(\text{T24})$ which suggests that J82 has particular cell edge properties. In addition, a transition frequency f_T was introduced here in relation with our model. This frequency decreases with malignancy on the nucleus and the edge and can therefore be used as a pertinent marker of cell invasiveness.

5 Conclusions

A new method for characterizing the rheology of cancer cells has been developed in the range [1–300 Hz], together with the use of a realistic model containing a few parameters than can be used for describing changes in cell rheology or invasivity. By comparing the actin microstructure to the viscoelasticity of cancer cells by AFM, we showed that local properties are important and related to the actin organization in bladder cancer cell lines. In particular, we emphasized the higher rigidity of the cell periphery.

35. J.A. Santos, L.M. Rebelo, A.C. Araujo, E.B. Barros, J.S. de Sousa, *Soft Matter* **8**, 4441 (2012).
36. D. Stamenovic, N. Rosenblatt, M. Montoya-Zavala, B.D. Matthews, S. Hu, B. Suki, N. Wang, D.E. Ingber, *Biophys. J.* **93**, L39 (2007).
37. F. Chowdhury, S. Na, O. Collin, B. Tay, F. Li, T. Tanaka, D.E. Leckband, N. Wang, *Biophys. J.* **95**, 5719 (2008).
38. S.L. Gupton, C.M. Waterman-Storer, *Cell* **125**, 1361 (2006).
39. B.A. Smith, B. Tolloczko, J.G. Martin, P. Grutter, *Biophys. J.* **88**, 2994 (2005).
40. B. Fabry, G.N. Maksym, J.P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas, J.J. Fredberg, *Phys. Rev. Lett.* **87**, 148102 (2001).
41. P. Sollich, *Phys. Rev. E* **58**, 738 (1998).
42. J. Etienne, J. Fouchard, D. Mitrossilis, N. Bufi, P. Durand-Smet, A. Asnacios, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 2740 (2015).
43. P. Cai, Y. Mizutani, M. Tsuchiya, J.M. Maloney, B. Fabry, K.J. Van Vliet, T. Okajima, *Biophys. J.* **105**, 1093 (2013).
44. A. Rigato, F. Rico, F. Eghiaian, M. Piel, S. Scheuring, *ACS Nano* **9**, 5846 (2015).
45. L.M. Rebelo, J.S. de Sousa, J.M. Filho, M. Radmacher, *Nanotechnology* **24**, 055105 (2013).
46. S. Hiratsuka, Y. Mizutani, M. Tsuchiya, K. Kawahara, H. Tokumoto, T. Okajima, *Ultramicroscopy* **109**, 937 (2009).
47. C. Labouesse, A.B. Verkhovsky, J.J. Meister, C. Gabella, B. Vianay, *Biophys. J.* **108**, 2437 (2015).
48. M. Raftopoulou, A. Hall, *Dev. Biol.* **265**, 23 (2004).
49. L. Lu, S.J. Oswald, H. Ngu, F.C-P. Yin, *Biophys. J.* **95**, 6060 (2008).
50. P. Champelovier, A. Simon, C. Garrel, G. Levacher, V. Praloran, D. Seigneurin, *Clin. Cancer Res.* **9**, 4562 (2003).
51. V.M. Laurent, S. Kasas, A. Yersin, T.E. Schäffer, S. Catsicas, G. Dietler, A.B. Verkhovsky, J.-J. Meister, *Biophys. J.* **89**, 667 (2005).
52. V. Peschetola, V.M. Laurent, A. Duperray, R. Michel, D. Ambrosi, L. Preziosi, C. Verdier, *Cytoskeleton* **70**, 201 (2013).

Bibliographie

- A-Hassan, E., Heinz, W. F., Antonik, M. D., D’Costa, N. P., Nageswaran, S., Schoenberger, C. A., and Hoh, J. H. (1998). Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy. *Biophys J*, 74(3) :1564–1578. [1.4.1](#)
- Abidine, Y., Laurent, V. M., Michel, R., Duperray, A., Palade, L. I., and Verdier, C. (2015a). Physical properties of polyacrylamide gels probed by afm and rheology. *EPL (Europhysics Letters)*, 109(3) :38003. [2](#), [2.3](#), [3.2.5](#), [5](#)
- Abidine, Y., Laurent, V. M., Michel, R., Duperray, A., and Verdier, C. (2015b). Local mechanical properties of bladder cancer cells measured by afm as a signature of metastatic potential. *EPJ Plus*, 130 :202. [3](#)
- Ahmed, W. W., Étienne Fodor, and Betz, T. (2015). Active cell mechanics : Measurement and theory. *Biochim Biophys Acta*. [1.19](#)
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter., P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. [1.1.1](#), [1.2](#), [1.2.2](#), [1.1](#), [1.10](#), [1.11](#), [1.13](#)
- Alcaraz, J., Buscemi, L., de Morales, M. P., Colchero, J., Baro, A., and Navajas, D. (2002). Correction of microrheological measurements of soft samples with atomic force microscopy for the hydrodynamic drag on the cantilever. pages 716–721. [2.2.4.2](#), [2.2.4.2](#)
- Alcaraz, J., Buscemi, L., Grabulosa, M., Trepas, X., Fabry, B., Farré, R., and Navajas, D. (2003). Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy. *Biophys J*, 84(3) :2071–2079. [1.1.3.2](#), [1.4.1.2](#), [1.4.2](#), [1.4.3.2](#), [2.2.3](#), [3.3.1](#)
- Ali, M. H. and Schumacker, P. T. (2002). Endothelial responses to mechanical stress : where is the mechanosensor ? *Crit Care Med*, 30(5 Suppl) :S198–S206. [1.1.1](#)
- Ananthakrishnan, R. and Ehrlicher, A. (2007). The forces behind cell movement. *Int J Biol Sci*, 3(5) :303–317. [1.1.2](#)
- Ashkin, A. (1992). Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophys J*, 61(2) :569–582. [1.4.1.1](#), [1.4.2](#)

-
- Audersirk, T. and Audersirk, G. (1998). *Biology : Life on Earth*, volume 5th edition. [1.5](#)
- Bagley, R. L. and Torvik, P. J. (1983). A theoretical basis for the application of fractional calculus to viscoelasticity. *J. Rheol.*, 27(3) :201–210. [2.3.4.2](#), [2.3.4.2](#)
- Bao, G. and Suresh, S. (2003). Cell and molecular mechanics of biological materials. *Nat Mater*, 2(11) :715–725. [1.1](#), [1.1.1](#), [1.1.2](#), [3.3.1](#)
- Baumgaertel, M., Rosa, M. E. D., Machado, J., Masse, M., and Winter, H. H. (1992). The relaxation time spectrum of nearly monodisperse polybutadiene melts. *Rheol. Acta*, 31 :75–82. [2.3.1.2](#), [2.3.4.2](#), [2.3.4.2](#)
- Bausch, A. R. and Kroy, K. (2006). A bottom-up approach to cell mechanics. *Nature Physics*, 2 :231–238. [1.2](#), [1.2.4](#)
- Bausch, A. R., Ziemann, F., Boulbitch, A. A., Jacobson, K., and Sackmann, E. (1998). Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry. *Biophys J*, 75(4) :2038–2049. [1.1.3.2](#)
- Bear, J. E., Svitkina, T. M., Krause, M., Schafer, D. A., Loureiro, J. J., Strasser, G. A., Maly, I. V., Chaga, O. Y., Cooper, J. A., Borisy, G. G., and Gertler, F. B. (2002). Antagonism between ena/vasp proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell*, 109(4) :509–521. [1.1.2](#)
- Beloussov, L. V., Dorfman, J. G., and Cherdantzev, V. G. (1975). Mechanical stresses and morphological patterns in amphibian embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 34(3) :559–574. [1.1.1](#)
- Bershadsky, A., Kozlov, M., and Geiger, B. (2006). Adhesion-mediated mechanosensitivity : a time to experiment, and a time to theorize. *Curr Opin Cell Biol*, 18(5) :472–481. [1.1.1](#), [1.1.2](#)
- Bilodeau, G. (1992). Regular pyramid punch problem. *J.Appl. Mech*, 59 :519–523. [2.2.3](#)
- Binnig, Quate, and Gerber (1986). Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 56(9) :930–933. [2.1.1](#)
- Brangwynne, C. P., MacKintosh, F. C., Kumar, S., Geisse, N. A., Talbot, J., Mahadevan, L., Parker, K. K., Ingber, D. E., and Weitz, D. A. (2006). Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement. *J Cell Biol*, 173(5) :733–741. [1.2.3.1](#), [1.2.4](#)
- Bubb, M. R., Spector, I., Beyer, B. B., and Fosen, K. M. (2000). Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. an explanation for certain in vivo observations. *J Biol Chem*, 275(7) :5163–5170. [3.2.2](#)

-
- Butt, H. J. and Jaschke, M. (1995). Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 6(1) :1. [2.2.2](#)
- Buxboim, A., Ivanovska, I. L., and Discher, D. E. (2010). Matrix elasticity, cytoskeletal forces and physics of the nucleus : how deeply do cells 'feel' outside and in? *J Cell Sci*, 123(Pt 3) :297–308. [1.1.2](#)
- Cai, P., Mizutani, Y., Tsuchiya, M., Maloney, J. M., Fabry, B., Vliet, K. J. V., and Okajima, T. (2013). Quantifying cell-to-cell variation in power-law rheology. *Biophys J*, 105(5) :1093–1102. [3.3.1](#), [3.3.2.2](#), [3.3.2.4](#)
- Calderwood, D. A., Zent, R., Grant, R., Rees, D. J., Hynes, R. O., and Ginsberg, M. H. (1999). The talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem*, 274(40) :28071–28074. [1.1.2](#)
- Champelovier, P., Simon, A., Garrel, C., Levacher, G., Praloran, V., and Seigneurin, D. (2003). Is interferon gamma one key of metastatic potential increase in human bladder carcinoma? *Clin Cancer Res*, 9(12) :4562–4569. [3.4](#)
- Chaudhuri, O. and Fletcher, D. A. (2010). *Protrusive forces generated by dendritic actin networks during cell crawling* publed. [1.1.2](#)
- Chaudhuri, O., Parekh, S. H., and Fletcher, D. A. (2007). Reversible stress softening of actin networks. *Nature*, 445(7125) :295–298. [1.2.3.2](#), [1.12](#)
- Chen, C. S. (2008). Mechanotransduction - a field pulling together? *J Cell Sci*, 121(Pt 20) :3285–3292. [1.2.5](#)
- Cheng, G., Tse, J., Jain, R. K., and Munn, L. L. (2009). Micro-environmental mechanical stress controls tumor spheroid size and morphology by suppressing proliferation and inducing apoptosis in cancer cells. *PLoS One*, 4(2) :e4632. [1.1.2](#)
- Choi, C. K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L. A., Mogilner, A., and Horwitz, A. R. (2008). Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin ii motor-independent manner. *Nat Cell Biol*, 10(9) :1039–1050. [1.1.2](#)
- Choquet, D., Felsenfeld, D. P., and Sheetz, M. P. (1997). Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell*, 88(1) :39–48. [1.1.3.2](#)
- Citters, K. M. V., Hoffman, B. D., Massiera, G., and Crocker, J. C. (2006). The role of f-actin and myosin in epithelial cell rheology. *Biophys J*, 91(10) :3946–3956. [3.3.2.2](#), [3.3.2.4](#)
- Costa, K. D., Sim, A. J., and Yin, F. C.-P. (2006). Non-hertzian approach to analyzing mechanical properties of endothelial cells probed by atomic force microscopy. *J Biomech Eng*, 128(2) :176–184. [1.4.1.2](#), [3.3.2.4](#)

-
- Costa, K. D. and Yin, F. C. (1999). Analysis of indentation : implications for measuring mechanical properties with atomic force microscopy. *J Biomech Eng*, 121(5) :462–471. [2.3.2](#)
- Cox, R. G. and Brenner, H. (1967). The slow motion of a sphere through a viscous fluid towards a plane surface—ii small gap widths, including inertial effects. *Chem. Eng. Sci*, 22 :1753–1777. [2.2.4.2](#)
- Crocker, J. C., Valentine, M. T., Weeks, E. R., Gisler, T., Kaplan, P. D., Yodh, A. G., and Weitz, D. A. (2000). Two-point microrheology of inhomogeneous soft materials. *Phys Rev Lett*, 85(4) :888–891. [1.4.2](#)
- Cross, S. E., Jin, Y.-S., Tondre, J., Wong, R., Rao, J., and Gimzewski, J. K. (2008). Afm-based analysis of human metastatic cancer cells. *Nanotechnology*, 19(38) :384003. [1.1.1](#)
- Daumas, F., Destainville, N., Millot, C., Lopez, A., Dean, D., and Salomé, L. (2003). Confined diffusion without fences of a g-protein-coupled receptor as revealed by single particle tracking. *Biophys J*, 84(1) :356–366. [1.2.2](#)
- de Gennes, P.-G. (1976). Dynamics of entangled polymer solutions. i. the rouse model. *Macromolecules*, 9 :587–593. [2.3.5](#)
- Desai, A. and Mitchison, T. J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13 :83–117. [1.2.3.1](#)
- Dimitriadis, E. K., Horkay, F., Maresca, J., Kachar, B., and Chadwick, R. S. (2002). Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophys J*, 82(5) :2798–2810. [2.2.3](#), [2.2.4.3](#), [2.3.2](#)
- Discher, D. E., Janmey, P., and Wang, Y.-L. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310(5751) :1139–1143. [1](#), [1.2.5](#)
- Dong, C., Skalak, R., Sung, K. L., Schmid-Schönbein, G. W., and Chien, S. (1988). Passive deformation analysis of human leukocytes. *J Biomech Eng*, 110(1) :27–36. [1.4.3.1](#)
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., and Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4) :677–689. [1](#), [1.1.2](#)
- Etienne, J., Fouchard, J., Mitrossilis, D., Bufi, N., Durand-Smet, P., and Asnacios, A. (2015). Cells as liquid motors : mechanosensitivity emerges from collective dynamics of actomyosin cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(9) :2740–2745. [1.2.4](#), [1.4.3.4](#)
- Eyckmans, J., Boudou, T., Yu, X., and Chen, C. S. (2011). A hitchhiker’s guide to mechanobiology. *Dev Cell*, 21(1) :35–47. [1](#)

-
- Fabry, B., Maksym, G. N., Butler, J. P., Glogauer, M., Navajas, D., and Fredberg, J. J. (2001). Scaling the microrheology of living cells. *Phys Rev Lett*, 87(14) :148102. [1.1.3.2](#), [1.4.1](#), [1.4.1.1](#), [1.4.3](#), [1.4.2](#), [1.4.3.2](#), [2](#), [3.3.1](#)
- Fernández, P. and Ott, A. (2008). Single cell mechanics : stress stiffening and kinematic hardening. *Phys Rev Lett*, 100(23) :238102. [1.4.2](#)
- Fernández, P., Pullarkat, P. A., and Ott, A. (2006). A master relation defines the nonlinear viscoelasticity of single fibroblasts. *Biophys J*, 90(10) :3796–3805. [1.1.3.2](#)
- Fisher, A. B., Chien, S., Barakat, A. I., and Nerem, R. M. (2001). Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281(3) :L529–L533. [1.1.1](#)
- Fletcher, D. A. and Mullins, R. D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280) :485–492. [1.14](#)
- Flitney, E. W., Kuczmarski, E. R., Adam, S. A., and Goldman, R. D. (2009). Insights into the mechanical properties of epithelial cells : the effects of shear stress on the assembly and remodeling of keratin intermediate filaments. *FASEB J*, 23(7) :2110–2119. [1.2.3.3](#)
- Folkman, J. and Moscona, A. (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature*, 273(5661) :345–349. [1.3](#)
- Fraley, S. I., Feng, Y., Krishnamurthy, R., Kim, D.-H., Celedon, A., Longmore, G. D., and Wirtz, D. (2010). A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility. *Nat Cell Biol*, 12(6) :598–604. [1.3](#)
- Fredberg, J. J. and Stamenovic, D. (1989). On the imperfect elasticity of lung tissue. *J Appl Physiol (1985)*, 67(6) :2408–2419. [1.1.1](#)
- Freundlich, H. and Seifriz, W. (1922). Ueber die elastizität der solen und gelen. *Zeitschr. Phys. Chem*, 104 :233. [1.1.1](#)
- Fu, J., Wang, Y.-K., Yang, M. T., Desai, R. A., Yu, X., Liu, Z., and Chen, C. S. (2010). Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nat Methods*, 7(9) :733–736. [1.4.1](#)
- Fudge, D. S., Gardner, K. H., Forsyth, V. T., Riekel, C., and Gosline, J. M. (2003). The mechanical properties of hydrated intermediate filaments : insights from hagfish slime threads. *Biophys J*, 85(3) :2015–2027. [1.1](#), [1.2.3.3](#)
- Fung, Y. C. (1993). *Biomechanics : mechanical properties of living tissues*. [1.1.1](#)
- Féréol, S., Fodil, R., Pelle, G., Louis, B., and Isabey, D. (2008). Cell mechanics of alveolar epithelial cells (aecs) and macrophages (ams). *Respir Physiol Neurobiol*, 163(1-3) :3–16. [1.4.2](#), [1.4.3.2](#)

-
- Galbraith, C. G., Yamada, K. M., and Galbraith, J. A. (2007). Polymerizing actin fibers position integrins primed to probe for adhesion sites. *Science*, 315(5814) :992–995. [1.1.2](#), [1.4.3.4](#)
- Gardel, M. L., Nakamura, F., Hartwig, J., Crocker, J. C., Stossel, T. P., and Weitz, D. A. (2006). Stress-dependent elasticity of composite actin networks as a model for cell behavior. *Phys Rev Lett*, 96(8) :088102. [1.1.3.2](#), [1.2.3.2](#), [1.2.4](#)
- Gardel, M. L., Schneider, I. C., Aratyn-Schaus, Y., and Waterman, C. M. (2010). Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 26 :315–333. [1](#)
- Gardel, M. L., Shin, J. H., MacKintosh, F. C., Mahadevan, L., Matsudaira, P., and Weitz, D. A. (2004). Elastic behavior of cross-linked and bundled actin networks. *Science*, 304(5675) :1301–1305. [1.2.3.2](#), [1.2.4](#)
- Geiger, B., Spatz, J. P., and Bershadsky, A. D. (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(1) :21–33. [1.1.2](#)
- Gittes, F. and MacKintosh, F. C. (1998). Dynamic shear modulus of a semiflexible polymer network. *Phys. Rev. E*, 58 :R1241. [2.3.5](#)
- Glenister, F. K., Coppel, R. L., Cowman, A. F., Mohandas, N., and Cooke, B. M. (2002). Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells. *Blood*, 99(3) :1060–1063. [1.1.1](#)
- Gomez, G. A., McLachlan, R. W., and Yap, A. S. (2011). Productive tension : force-sensing and homeostasis of cell-cell junctions. *Trends Cell Biol*, 21(9) :499–505. [1.1.2](#)
- Grevesse, T., Versaevel, M., Circelli, G., Desprez, S., and Gabriele, S. (2013). A simple route to functionalize polyacrylamide hydrogels for the independent tuning of mechanotransduction cues. *Lab Chip*, 13(5) :777–780. [4.1.1](#), [C](#)
- Guck, J., Ananthakrishnan, R., Mahmood, H., Moon, T. J., Cunningham, C. C., and Käs, J. (2001). The optical stretcher : a novel laser tool to micromanipulate cells. *Biophys J*, 81(2) :767–784. [1.4.1](#), [1.4.2](#)
- Guck, J., Schinkinger, S., Lincoln, B., Wottawah, F., Ebert, S., Romeyke, M., Lenz, D., Erickson, H. M., Ananthakrishnan, R., Mitchell, D., Käs, J., Ulvick, S., and Bilby, C. (2005). Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence. *Biophys J*, 88(5) :3689–3698. [1.2.4](#), [1.3](#)
- Guet, D., Mandal, K., Pinot, M., Hoffmann, J., Abidine, Y., Sigaut, W., Bardin, S., Schauer, K., Goud, B., and Manneville, J.-B. (2014). Mechanical role of actin

-
- dynamics in the rheology of the golgi complex and in golgi-associated trafficking events. *Curr Biol*, 24(15) :1700–1711. [1.4.2](#)
- Guo, M., Ehrlicher, A. J., Jensen, M. H., Renz, M., Moore, J. R., Goldman, R. D., Lippincott-Schwartz, J., Mackintosh, F. C., and Weitz, D. A. (2014). Probing the stochastic, motor-driven properties of the cytoplasm using force spectrum microscopy. *Cell*, 158(4) :822–832. [1.4.3.4](#)
- Guolla, L., Bertrand, M., Haase, K., and Pelling, A. E. (2012). Force transduction and strain dynamics in actin stress fibres in response to nanonewton forces. *J Cell Sci*, 125(Pt 3) :603–613. [1.1.2](#)
- Harris, A. K., Wild, P., and Stopak, D. (1980). Silicone rubber substrata : a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science*, 208(4440) :177–179. [1.1.1](#), [1.4.2](#)
- Harris, A. R. and Charras, G. T. (2011). Experimental validation of atomic force microscopy-based cell elasticity measurements. *Nanotechnology*, 22(34) :345102. [2.3.2](#)
- Hecht, A.-M. and Geissler, E. (1978). Dynamic light scattering from polyacrylamide–water gels. *J. Physique*, 39 :631–638. [2.3.5](#)
- Heidemann, S. R. and Wirtz, D. (2004). Towards a regional approach to cell mechanics. *Trends Cell Biol*, 14(4) :160–166. [1.1.3](#)
- Hessler, J. A., Budor, A., Putschakayala, K., Mecke, A., Rieger, D., Holl, M. M. B., Orr, B. G., Bielinska, A., Beals, J., and Baker, J. (2005). Atomic force microscopy study of early morphological changes during apoptosis. *Langmuir*, 21(20) :9280–9286. [1.1.1](#)
- Heuberger, M., Dietler, G., and Schlapbach, L. (1996). Elastic deformations of tip and sample during atomic force microscope measurement. *Journal of Vacuum Science & Technol B*, 14 :1250–1254. [2.2.1](#)
- Hinner, B., Tempel, M., Sackmann, E., Kroy, K., and Frey, E. (1998). Entanglement, elasticity, and viscous relaxation of actin solutions. *Phys. Rev. Lett.*, 81(12) :2614–2617. [2.3.5](#)
- Hinz, B. and Gabbiani, G. (2003). Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol*, 14(5) :538–546. [1.1.2](#)
- Hiratsuka, S., Mizutani, Y., Tsuchiya, M., Kawahara, K., Tokumoto, H., and Okajima, T. (2009). The number distribution of complex shear modulus of single cells measured by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 109(8) :937–941. [3.3.2.2](#)
- Hochmuth, R. M. (1987). *Handbook of Bioengineering*. [1.1.1](#)

-
- Hochmuth, R. M. (2000). Micropipette aspiration of living cells. *J Biomech*, 33(1) :15–22. [1.4.2](#)
- Hoffman, B. D. and Crocker, J. C. (2009). Cell mechanics : dissecting the physical responses of cells to force. *Annu Rev Biomed Eng*, 11 :259–288. [1.1.3](#), [1.4.3.4](#)
- Holy, T. E. and Leibler, S. (1994). Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(12) :5682–5685. [1.2.3.1](#)
- Huang, S. and Ingber, D. E. (2005). Cell tension, matrix mechanics, and cancer development. *Cancer Cell*, 8(3) :175–176. [1.3](#), [1.3](#)
- Humphrey, D., Duggan, C., Saha, D., Smith, D., and Käs, J. (2002). Active fluidization of polymer networks through molecular motors. *Nature*, 416(6879) :413–416. [1.2.4](#)
- Humphrey, J. (2002). *Cardiovascular solid mechanics : cells, tissues, organs*. [1.1.1](#)
- Hutter, J. L. and Bechhoefer, J. (1993). Calibration of atomic force microscope tips. 64. [2.2](#), [2.2.2](#)
- Hynes, R. O. (2009). The extracellular matrix : not just pretty fibrils. *Science*, 326(5957) :1216–1219. [4](#)
- Hénon, S., Lenormand, G., Richert, A., and Gallet, F. (1999). A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. *Biophys J*, 76(2) :1145–1151. [1.4.2](#), [2](#)
- Ingber, D. E. (1998). The architecture of life. *Sci Am*, 278(1) :48–57. [1.8](#)
- Ingber, D. E., Prusty, D., Sun, Z., Betensky, H., and Wang, N. (1995). Cell shape, cytoskeletal mechanics, and cell cycle control in angiogenesis. *J Biomech*, 28(12) :1471–1484. [1.1](#), [1.3](#)
- Iordan, A., Duperray, A., Gérard, A., Grichine, A., and Verdier, C. (2010). Break-down of cell-collagen networks through collagen remodeling. *Biorheology*, 47 :277–295. [1.1.2](#), [2.3.5](#), [4.1](#)
- Janmey, P. A. (1998). The cytoskeleton and cell signaling : component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev*, 78(3) :763–781. [1.1.3](#), [1.2.3.3](#)
- Janmey, P. A., Euteneuer, U., Traub, P., and Schliwa, M. (1991). Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *J Cell Biol*, 113(1) :155–160. [1.2.4](#), [1.2.4](#), [1.2.4](#)
- Janmey, P. A. and McCulloch, C. A. (2007). Cell mechanics : integrating cell responses to mechanical stimuli. *Annu Rev Biomed Eng*, 9 :1–34. [1.1.1](#), [1.2.4](#), [1.4](#)

-
- Janmey, P. A. and Miller, R. T. (2011). Mechanisms of mechanical signaling in development and disease. *J Cell Sci*, 124(Pt 1) :9–18. [1.1.2](#)
- Janmey, P. A., Winer, J. P., Murray, M. E., and Wen, Q. (2009). The hard life of soft cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 66(8) :597–605. [1.1.2](#)
- Janson, M. E. and Dogterom, M. (2004). A bending mode analysis for growing microtubules : evidence for a velocity-dependent rigidity. *Biophys J*, 87(4) :2723–2736. [1.2.4](#)
- Ji, L., Lim, J., and Danuser, G. (2008). Fluctuations of intracellular forces during cell protrusion. *Nat Cell Biol*, 10(12) :1393–1400. [1.1.2](#)
- Joanny, J.-F. and Prost, J. (2009). Active gels as a description of the actin-myosin cytoskeleton. *HFSP J*, 3(2) :94–104. [1.4.3.4](#)
- Johnson, K., Kendall, K., and Roberts, D. (1971). Surface energy and the contact of elastic solids. *Proceedings of the Royal Society of London Ser. A.*, 324 :247–390. [2.2.3](#)
- Jones, W. R., Ting-Beall, H. P., Lee, G. M., Kelley, S. S., Hochmuth, R. M., and Guilak, F. (1999). Alterations in the young’s modulus and volumetric properties of chondrocytes isolated from normal and osteoarthritic human cartilage. *J Biomech*, 32(2) :119–127. [1.4.3.1](#)
- Kasza, K. E., Rowat, A. C., Liu, J., Angelini, T. E., Brangwynne, C. P., Koenderink, G. H., and Weitz, D. A. (2007). The cell as a material. *Curr Opin Cell Biol*, 19(1) :101–107. [1.9](#)
- Kessler, D., Dethlefsen, S., Haase, I., Plomann, M., Hirche, F., Krieg, T., and Eckes, B. (2001). Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a ”synthetic” phenotype. *J Biol Chem*, 276(39) :36575–36585. [1.1.2](#)
- Koch, T. M., Münster, S., Bonakdar, N., Butler, J. P., and Fabry, B. (2012). 3d traction forces in cancer cell invasion. *PLoS One*, 7(3) :e33476. [1](#)
- Koenderink, G. H., Atakhorrami, M., MacKintosh, F. C., and Schmidt, C. F. (2006). High-frequency stress relaxation in semiflexible polymer solutions and networks. *Phys Rev Lett*, 96(13) :138307. [1.2.4](#)
- Koenderink, G. H., Dogic, Z., Nakamura, F., Bendix, P. M., MacKintosh, F. C., Hartwig, J. H., Stossel, T. P., and Weitz, D. A. (2009). An active biopolymer network controlled by molecular motors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(36) :15192–15197. [1.1.1](#)
- Koontongkaew, S. (2013). The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer*, 4(1) :66–83. [1.3](#)

-
- Korkaya, H., Liu, S., and Wicha, M. S. (2011). Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J Clin Invest*, 121(10) :3804–3809. [1.3](#)
- Korsunsky, A. and Constantinescu, A. (2009). The influence of indenter bluntness on the apparent contact stiffness of thin coatings. *Thin Solid Films*, 517 :4835–4844. [4](#), [4.3.1](#), [4.9](#), [4.3.1](#), [4.10](#), [4.3.1](#), [4.3.2](#)
- Kumar, S. and Weaver, V. M. (2009). Mechanics, malignancy, and metastasis : the force journey of a tumor cell. *Cancer Metastasis Rev*, 28(1-2) :113–127. [1](#)
- Kusumi, A., Sako, Y., and Yamamoto, M. (1993). Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. 65 :2021–40. [1.2.2](#)
- Kuznetsova, T. G., Starodubtseva, M. N., Yegorenkov, N. I., Chizhik, S. A., and Zhdanov, R. I. (2007). Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*, 38(8) :824–833. [2](#)
- Labouesse, C., Verkhovsky, A. B., Meister, J.-J., Gabella, C., and Vianay, B. (2015). Cell shape dynamics reveal balance of elasticity and contractility in peripheral arcs. *Biophys J*, 108(10) :2437–2447. [3.3.2.3](#)
- Lafaurie-Janvore, J., Maiuri, P., Wang, I., Pinot, M., Manneville, J.-B., Betz, T., Balland, M., and Piel, M. (2013). Escrt-iii assembly and cytokinetic abscission are induced by tension release in the intercellular bridge. *Science*, 339(6127) :1625–1629. [1.1.2](#)
- Landau, L. and Lifshitz, E. (1986). *Theory of Elasticity*. Pergamon Press, Oxford. [2.2.4.1](#)
- Larson, R. (1999). *The Structure and Rheology of Complex Fluids*. Oxford University Press, New York. [2.3.1.2](#)
- Lau, A. W. C., Hoffman, B. D., Davies, A., Crocker, J. C., and Lubensky, T. C. (2003). Microrheology, stress fluctuations, and active behavior of living cells. *Phys Rev Lett*, 91(19) :198101. [1.4.1.3](#)
- Laurent, V. M., Fodil, R., Cañadas, P., Féréol, S., Louis, B., Planus, E., and Isabey, D. (2003). Partitioning of cortical and deep cytoskeleton responses from transient magnetic bead twisting. *Ann Biomed Eng*, 31(10) :1263–1278. [1.1.1](#), [1.4.1.1](#), [1.4.3.3](#)
- Laurent, V. M., Hénon, S., Planus, E., Fodil, R., Balland, M., Isabey, D., and Gallet, F. (2002). Assessment of mechanical properties of adherent living cells by

-
- bead micromanipulation : comparison of magnetic twisting cytometry vs optical tweezers. *J Biomech Eng*, 124(4) :408–421. [1.4.1.1](#)
- Lee, C.-F., Haase, C., Deguchi, S., and Kaunas, R. (2010). Cyclic stretch-induced stress fiber dynamics - dependence on strain rate, rho-kinase and mlck. *Biochem Biophys Res Commun*, 401(3) :344–349. [1.1.3.2](#)
- Legant, W. R., Choi, C. K., Miller, J. S., Shao, L., Gao, L., Betzig, E., and Chen, C. S. (2013). Multidimensional traction force microscopy reveals out-of-plane rotational moments about focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(3) :881–886. [1.4.1](#)
- Lekka, M., Laidler, P., Gil, D., Lekki, J., Stachura, Z., and Hryniewicz, A. Z. (1999). Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *Eur Biophys J*, 28(4) :312–316. [1.1.1](#), [1.3](#)
- Levayer, R. and Lecuit, T. (2012). Biomechanical regulation of contractility : spatial control and dynamics. *Trends Cell Biol*, 22(2) :61–81. [1.1.1](#), [1.4.3.4](#)
- Levine and Lubensky (2000). One- and two-particle microrheology. *Phys Rev Lett*, 85(8) :1774–1777. [1.4.1.3](#)
- Li, Z., Anvari, B., Takashima, M., Brecht, P., Torres, J. H., and Brownell, W. E. (2002). Membrane tether formation from outer hair cells with optical tweezers. *Biophys J*, 82(3) :1386–1395. [1.4.1](#)
- Lim, C. T., Zhou, E. H., and Quek, S. T. (2006). Mechanical models for living cells—a review. *J Biomech*, 39(2) :195–216. [1.4.3](#)
- Lin, Y.-C., Yao, N. Y., Broedersz, C. P., Herrmann, H., Mackintosh, F. C., and Weitz, D. A. (2010). Origins of elasticity in intermediate filament networks. *Phys Rev Lett*, 104(5) :058101. [1.2.4](#)
- Liu, Z., Tan, J. L., Cohen, D. M., Yang, M. T., Sniadecki, N. J., Ruiz, S. A., Nelson, C. M., and Chen, C. S. (2010). Mechanical tugging force regulates the size of cell-cell junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(22) :9944–9949. [1.1.2](#)
- Lu, L., Oswald, S. J., Ngu, H., and Yin, F. C.-P. (2008). Mechanical properties of actin stress fibers in living cells. *Biophys J*, 95(12) :6060–6071. [3.3.2.4](#)
- Lu, P., Weaver, V. M., and Werb, Z. (2012). The extracellular matrix : a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*, 196(4) :395–406. [4.1](#)
- Machesky, L. M., Mullins, R. D., Higgs, H. N., Kaiser, D. A., Blanchoin, L., May, R. C., Hall, M. E., and Pollard, T. D. (1999). Scar, a wasp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7) :3739–3744. [1.2.3.2](#)

-
- Mackintosh, C., Douglas, P., and Lillo, C. (1995). Identification of a protein that inhibits the phosphorylated form of nitrate reductase from spinach (*spinacia oleracea*) leaves. *Plant Physiol*, 107(2) :451–457. [1.2.3.2](#), [1.2.4](#)
- Mackintosh, F. C. and Schmidt, C. F. (2010). Active cellular materials. *Curr Opin Cell Biol*, 22(1) :29–35. [1.4.3.4](#)
- Mahaffy, R. E., Park, S., Gerde, E., Käs, J., and Shih, C. K. (2004). Quantitative analysis of the viscoelastic properties of thin regions of fibroblasts using atomic force microscopy. *Biophys J*, 86(3) :1777–1793. [1.1.3.2](#), [1.4.2](#), [2.2.4.3](#)
- Mahaffy, R. E., Shih, C. K., MacKintosh, F. C., and Käs, J. (2000). Scanning probe-based frequency-dependent microrheology of polymer gels and biological cells. *Phys Rev Lett*, 85(4) :880–883. [1.1.3.2](#), [1.4.1](#), [1.4.1.2](#), [1.4.3.2](#), [2.2.3](#), [2.2.4.1](#)
- Maksym, G. N., Fabry, B., Butler, J. P., Navajas, D., Tschumperlin, D. J., Laporte, J. D., and Fredberg, J. J. (2000). Mechanical properties of cultured human airway smooth muscle cells from 0.05 to 0.4 hz. *J Appl Physiol (1985)*, 89(4) :1619–1632. [1.1.3.2](#), [1.4.1.1](#), [1.4.2](#), [1.4.3.2](#)
- Martens, J. C. and Radmacher, M. (2008). Softening of the actin cytoskeleton by inhibition of myosin ii. *Pflugers Arch*, 456(1) :95–100. [1.1.1](#)
- Mast, S. O. (1923). Mechanics of locomotion in amoeba. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 9(7) :258–261. [1.2.4](#)
- Mathur, A. B., Collinsworth, A. M., Reichert, W. M., Kraus, W. E., and Truskey, G. A. (2001). Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy. *J Biomech*, 34(12) :1545–1553. [1.1.3.2](#)
- Mbeunkui, F. and Johann, D. J. (2009). Cancer and the tumor microenvironment : a review of an essential relationship. *Cancer Chemother Pharmacol*, 63(4) :571–582. [1.3](#)
- Mijailovich, S. M., Kojic, M., Zivkovic, M., Fabry, B., and Fredberg, J. J. (2002). A finite element model of cell deformation during magnetic bead twisting. *J Appl Physiol (1985)*, 93(4) :1429–1436. [1.4.3.1](#)
- Mikhailov, A. S. and Hess, B. (2002). Self-organization in living cells : networks of protein machines and nonequilibrium soft matter. *J Biol Phys*, 28(4) :655–672. [1.4.3.4](#)
- Mills, J. P., Diez-Silva, M., Quinn, D. J., Dao, M., Lang, M. J., Tan, K. S. W., Lim, C. T., Milon, G., David, P. H., Mercereau-Puijalon, O., Bonnefoy, S., and Suresh, S. (2007). Effect of plasmodial resa protein on deformability of human

-
- red blood cells harboring plasmodium falciparum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(22) :9213–9217. [1.1.1](#)
- Mitchison, T. and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, 312(5991) :237–242. [1.2.3.1](#)
- Mizuno, D., Tardin, C., Schmidt, C. F., and Mackintosh, F. C. (2007). Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks. *Science*, 315(5810) :370–373. [1.4.1.3](#), [1.4.3](#), [1.4.3.4](#)
- Moeendarbary, E. and Harris, A. R. (2014). Cell mechanics : principles, practices, and prospects. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 6(5) :371–388. [1.1.1](#), [1.1](#)
- Mofrad, M. (2006). *Cytoskeletal mechanics : models and measurements*. [1.2.3](#)
- Morrison, F. A. (2001). *Understanding Rheology*. Oxford University Press. [1.1.3.1](#)
- Narumiya, S., Ishizaki, T., and Uehata, M. (2000). Use and properties of rock-specific inhibitor y-27632. *Methods Enzymol*, 325 :273–284. [3.2.2](#)
- Neuman, K. C. and Nagy, A. (2008). Single-molecule force spectroscopy : optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Methods*, 5(6) :491–505. [1.4.1](#)
- Nyberg, P., Salo, T., and Kalluri, R. (2008). Tumor microenvironment and angiogenesis. *Front Biosci*, 13 :6537–6553. [1.3](#)
- Oh, M.-J., Kuhr, F., Byfield, F., and Levitan, I. (2012). Micropipette aspiration of substrate-attached cells to estimate cell stiffness. *J Vis Exp*, (67). [1.4.1](#)
- Ozaki, S., Kaneko, S., Podyma-Inoue, K. A., Yanagishita, M., and Soma, K. (2005). Modulation of extracellular matrix synthesis and alkaline phosphatase activity of periodontal ligament cells by mechanical stress. *J Periodontal Res*, 40(2) :110–117. [1.1.2](#)
- Palade, L. I., Verney, V., and Attané, P. (1996). A modified fractional model to describe the entire viscoelastic behavior of polybutadienes from flow to glassy regime. *Rheol. Acta*, 35 :265–273. [2.3.1.2](#), [2.3.4.2](#), [2.3.4.2](#)
- Pampaloni, F., Lattanzi, G., Jonás, A., Surrey, T., Frey, E., and Florin, E.-L. (2006). Thermal fluctuations of grafted microtubules provide evidence of a length-dependent persistence length. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(27) :10248–10253. [1.2.4](#)
- Park, J. E., Tan, H. S., Datta, A., Lai, R. C., Zhang, H., Meng, W., Lim, S. K., and Sze, S. K. (2010). Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Mol Cell Proteomics*, 9(6) :1085–1099. [1.3](#)

-
- Park, S., Koch, D., Cardenas, R., Käs, J., and Shih, C. K. (2005). Cell motility and local viscoelasticity of fibroblasts. *Biophys J*, 89(6) :4330–4342. [1.3](#)
- Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A., Reinhart-King, C. A., Margulies, S. S., Dembo, M., Boettiger, D., Hammer, D. A., and Weaver, V. M. (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, 8(3) :241–254. [1.1.2](#), [1.3](#), [1.18](#), [1.3](#)
- Pollard, T. D. and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112(4) :453–465. [1.2.3.2](#)
- Pravincumar, P., Bader, D. L., and Knight, M. M. (2012). Viscoelastic cell mechanics and actin remodelling are dependent on the rate of applied pressure. *PLoS One*, 7(9) :e43938. [1.1.2](#)
- Prost, J., Julicher, F., and Joanny, J.-F. (2015). Active gel physics. *Nature Physics*, 11(2). [1.1.1](#), [1.4.3.4](#)
- Provenzano, P. P. and Vanderby, R. (2006). Collagen fibril morphology and organization : implications for force transmission in ligament and tendon. *Matrix Biol*, 25(2) :71–84. [1.1.2](#)
- Puig-De-Morales, M., Grabulosa, M., Alcaraz, J., Mullol, J., Maksym, G. N., Fredberg, J. J., and Navajas, D. (2001). Measurement of cell microrheology by magnetic twisting cytometry with frequency domain demodulation. *J Appl Physiol* (1985), 91(3) :1152–1159. [1.1.3.2](#)
- Pérez-Tamayo, R. (1978). Pathology of collagen degradation. a review. *Am J Pathol*, 92(2) :508–566. [1.1.2](#)
- Radmacher, M. (2007). Studying the mechanics of cellular processes by atomic force microscopy. *Methods Cell Biol*, 83 :347–372. [1.4.1.2](#)
- Radmacher, M., Fritz, M., Kacher, C. M., Cleveland, J. P., and Hansma, P. K. (1996). Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophys J*, 70(1) :556–567. [1.1.1](#)
- Radmacher, M., Tillmann, R. W., and Gaub, H. E. (1993). Imaging viscoelasticity by force modulation with the atomic force microscope. *Biophys J*, 64(3) :735–742. [1.4.1.2](#)
- Raftopoulou, M. and Hall, A. (2004). Cell migration : Rho gtpases lead the way. *Dev Biol*, 265(1) :23–32. [3.3.2.3](#)
- Ramos, J. R., Pabijan, J., Garcia, R., and Lekka, M. (2014). The softening of human bladder cancer cells happens at an early stage of the malignancy process. *Beilstein J Nanotechnol*, 5 :447–457. [3.4.2](#)

-
- Rebelo, L. M., de Sousa, J. S., Filho, J. M., and Radmacher, M. (2013). Comparison of the viscoelastic properties of cells from different kidney cancer phenotypes measured with atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 24(5) :055102. [3.3.1](#)
- Reinhart-King, C. A., Dembo, M., and Hammer, D. A. (2008). Cell-cell mechanical communication through compliant substrates. *Biophys J*, 95(12) :6044–6051. [1.1.2](#)
- Renner, W., Franke, W. W., Schmid, E., Geisler, N., Weber, K., and Mandelkow, E. (1981). Reconstitution of intermediate-sized filaments from denatured monomeric vimentin. *J Mol Biol*, 149(2) :285–306. [1.2.3.3](#)
- Rico, F., Roca-Cusachs, P., Gavara, N., Farré, R., Rotger, M., and Navajas, D. (2005). Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 72(2 Pt 1) :021914. [1.4.1.2](#)
- Ridley, A. (1996). Rho : theme and variations. *Curr Biol.*, 6 :1256–64. [3.2.2](#)
- Rigato, A., Rico, F., Eghiaian, F., Piel, M., and Scheuring, S. (2015). Atomic force microscopy mechanical mapping of micropatterned cells shows adhesion geometry-dependent mechanical response on local and global scales. *ACS Nano*. [3.3.1](#), [5](#)
- Robinson, B. D., Sica, G. L., Liu, Y.-F., Rohan, T. E., Gertler, F. B., Condeelis, J. S., and Jones, J. G. (2009). Tumor microenvironment of metastasis in human breast carcinoma : a potential prognostic marker linked to hematogenous dissemination. *Clin Cancer Res*, 15(7) :2433–2441. [1.3](#)
- Rosenbluth, M. J., Lam, W. A., and Fletcher, D. A. (2006). Force microscopy of nonadherent cells : a comparison of leukemia cell deformability. *Biophys J*, 90(8) :2994–3003. [1.4.2](#)
- Rosenhof, R. (1744). [1.1.1](#)
- Rother, J., Nöding, H., Mey, I., and Janshoff, A. (2014). Atomic force microscopy-based microrheology reveals significant differences in the viscoelastic response between malign and benign cell lines. *Open Biol*, 4(5) :140046. [1.1.1](#), [1.3](#), [1.4.1.2](#), [1.4.2](#), [3.3.1](#), [3.4](#), [3.4.2](#)
- Rotsch, C., Braet, F., Wisse, E., and Radmacher, M. (1997). Afm imaging and elasticity measurements on living rat liver macrophages. *Cell Biol Int*, 21(11) :685–696. [1.4.2](#)
- Rotsch, C. and Radmacher, M. (2000). Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts : an atomic force microscopy study. *Biophys J*, 78(1) :520–535. [1.1.1](#), [1.1.3.2](#), [2](#)

-
- Saha, K., Keung, A. J., Irwin, E. F., Li, Y., Little, L., Schaffer, D. V., and Healy, K. E. (2008). Substrate modulus directs neural stem cell behavior. *Biophys J*, 95(9) :4426–4438. [1.1.2](#)
- Santos, J. A. C., Rebelo, L. M., Araujo, A. C., Barros, E. B., and de Sousa, J. S. (2012). Thickness-corrected model for nanoindentation of thin films with conical indenters. *Soft Matter*, 8 :4441–4448. [2.2.4.3](#), [4.3.1](#)
- Schmidt, C. F., Barmann, M., Isenberg, G., and Sackmann, E. (1989). Chain dynamics, mesh size, and diffusive transport in networks of polymerized actin : a quasielastic light scattering and microfluorescence study. *Macromolecules*, 22 :3638–11. [1.2.3.2](#)
- Seifriz, W. (1923). An elastic value of protoplasm, with further observations on the viscosity of protoplasm. *J. Exp. Biol.*, 2 :1–11. [1.1.1](#)
- Sheetz, M. P., Felsenfeld, D. P., and Galbraith, C. G. (1998). Cell migration : regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol*, 8(2) :51–54. [1.4.2](#)
- Simmons, R. M., Finer, J. T., Chu, S., and Spudich, J. A. (1996). Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap. *Biophys J*, 70(4) :1813–1822. [1.4.1](#)
- Smith, B. A., Tolloczko, B., Martin, J. G., and Grütter, P. (2005). Probing the viscoelastic behavior of cultured airway smooth muscle cells with atomic force microscopy : stiffening induced by contractile agonist. *Biophys J*, 88(4) :2994–3007. [3.3.1](#)
- Sneddon, I. N. (1951). *Fourier transforms*. New York : McGraw-Hill, 1st ed edition. [1.4.1.2](#)
- Sneddon, I. N. (1965). The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International Journal of Engineering Science*, 3 :47–57. [2.2.3](#)
- Sollich, P. (1998). Rheological constitutive equation for a model of soft glassy materials. *Phys. Rev. E*, 58(1) :738–759. [1.4.3.2](#), [3.3.1](#)
- Solon, J., Levental, I., Sengupta, K., Georges, P. C., and Janmey, P. A. (2007). Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophys J*, 93(12) :4453–4461. [4.4](#)
- Stamenovic, D. (2005). Effects of cytoskeletal prestress on cell rheological behavior. *Acta Biomater*, 1(3) :255–262. [1.4.3.3](#)

-
- Stamenović, D. and Ingber, D. E. (2002). Models of cytoskeletal mechanics of adherent cells. *Biomech Model Mechanobiol*, 1(1) :95–108. [1.4.3](#)
- Stark, D. J., Killian, T. C., and Raphael, R. M. (2011). A microfabricated magnetic force transducer-microaspiration system for studying membrane mechanics. *Phys Biol*, 8(5) :056008. [1.4.1](#)
- Storm, C., Pastore, J. J., MacKintosh, F. C., Lubensky, T. C., and Janmey, P. A. (2005). Nonlinear elasticity in biological gels. *Nature*, 435(7039) :191–194. [1.2.3.2](#), [1.2.4](#)
- Stossel, T. P. (1993). On the crawling of animal cells. *Science*, 260(5111) :1086–1094. [1.1.1](#)
- Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z. R., Du, J., Davis, A., Mongare, M. M., Gould, J., Frederick, D. T., Cooper, Z. A., Chapman, P. B., Solit, D. B., Ribas, A., Lo, R. S., Flaherty, K. T., Ogino, S., Wargo, J. A., and Golub, T. R. (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to raf inhibitors through hgf secretion. *Nature*, 487(7408) :500–504. [1.3](#)
- Suresh, S. (2006). Mechanical response of human red blood cells in health and disease : some structure-property-function relationships. *J Mater Res.*, 21 :1871–1878. [1.1.1](#)
- Suresh, S. (2007). Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Biomater*, 3(4) :413–438. [1](#), [1.1](#), [1.1.1](#), [1.6](#), [1.2.3](#), [1.15](#), [1.16](#)
- Tadokoro, S., Shattil, S. J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R. C., de Pereda, J. M., Ginsberg, M. H., and Calderwood, D. A. (2003). Talin binding to integrin beta tails : a final common step in integrin activation. *Science*, 302(5642) :103–106. [1.1.2](#)
- Takai, E., Landesberg, R., Katz, R. W., Hung, C. T., and Guo, X. E. (2006). Substrate modulation of osteoblast adhesion strength, focal adhesion kinase activation, and responsiveness to mechanical stimuli. *Mol Cell Biomech*, 3(1) :1–12. [1.2.4](#)
- Talbot, L. J., Bhattacharya, S. D., and Kuo, P. C. (2012). Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies. *Int J Biochem Mol Biol*, 3(2) :117–136. [1.3](#)
- Thompson, D. W. (1917). *On Growth and Form*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. [1.1.1](#)
- Thoumine, O. and Ott, A. (1996). Influence of adhesion and cytoskeletal integrity on fibroblast traction. *Cell Motil Cytoskeleton*, 35(3) :269–280. [2](#)

-
- Théry, M., Racine, V., Pépin, A., Piel, M., Chen, Y., Sibarita, J.-B., and Bornens, M. (2005). The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat Cell Biol*, 7(10) :947–953. [1.1.2](#)
- Trepat, X., Deng, L., An, S. S., Navajas, D., Tschumperlin, D. J., Gerthoffer, W. T., Butler, J. P., and Fredberg, J. J. (2007). Universal physical responses to stretch in the living cell. *Nature*, 447(7144) :592–595. [1.1.3.2](#)
- Trickey, W. R., Vail, T. P., and Guilak, F. (2004). The role of the cytoskeleton in the viscoelastic properties of human articular chondrocytes. *J Orthop Res*, 22(1) :131–139. [1.2.4](#)
- Tsai, M.-Y., Wang, S., Heidinger, J. M., Shumaker, D. K., Adam, S. A., Goldman, R. D., and Zheng, Y. (2006). A mitotic lamin b matrix induced by rangtp required for spindle assembly. *Science*, 311(5769) :1887–1893. [1.2.3.3](#)
- Tschoegel, N. (1988). *The phenomenological theory of linear viscoelastic behavior. An introduction.* [1.1.3.1](#)
- Tzima, E., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W. B., Dejana, E., Schultz, D. A., Engelhardt, B., Cao, G., DeLisser, H., and Schwartz, M. A. (2005). A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*, 437(7057) :426–431. [1.1.2](#)
- Valiron, O., Caudron, N., and Job, D. (2001). Microtubule dynamics. 58 :2069–24. [1.2.3.1](#)
- Vargas-Pinto, R., Gong, H., Vahabikashi, A., and Johnson, M. (2013). The effect of the endothelial cell cortex on atomic force microscopy measurements. *Biophys J*, 105(2) :300–309. [2.3.2](#), [4.2.1](#)
- Veigel, C. and Schmidt, C. F. (2011). Moving into the cell : single-molecule studies of molecular motors in complex environments. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(3) :163–176. [1.1.2](#)
- Verdier, C. (2003). Review : Rheological properties of living materials. from cells to tissues. (2) :67–91. [1.3](#), [1.4](#)
- Verdier, C., Etienne, J., Duperray, A., and Preziosi, L. (2009). Review : Rheological properties of biological materials. *C. R. Acad. Sci. Phys.*, 10 :790–811. [1.1.3.1](#), [2.3.4.2](#)
- Vogel, V. and Sheetz, M. (2006). Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(4) :265–275. [1.1.1](#), [1.1.2](#)
- Wachsstock, D. H., Schwartz, W. H., and Pollard, T. D. (1993). Affinity of alpha-actinin for actin determines the structure and mechanical properties of actin filament gels. *Biophys J*, 65(1) :205–214. [1.2.4](#)

-
- Wakatsuki, T., Schwab, B., Thompson, N. C., and Elson, E. L. (2001). Effects of cytochalasin d and latrunculin b on mechanical properties of cells. *J Cell Sci*, 114(Pt 5) :1025–1036. [1.1.1](#)
- Wang, H. B., Dembo, M., and Wang, Y. L. (2000). Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279(5) :C1345–C1350. [1.3](#)
- Wang, N., Butler, J. P., and Ingber, D. E. (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 260(5111) :1124–1127. [1.1.2](#), [1.4.1.1](#), [1.4.2](#)
- Wang, S. and Wolynes, P. G. (2012). Active contractility in actomyosin networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(17) :6446–6451. [1.4.3.4](#)
- Watnick, R. S. (2012). The role of the tumor microenvironment in regulating angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(12) :a006676. [1.3](#)
- Weder, G., Hendriks-Balk, M. C., Smajda, R., Rimoldi, D., Liley, M., Heinzelmann, H., Meister, A., and Mariotti, A. (2014). Increased plasticity of the stiffness of melanoma cells correlates with their acquisition of metastatic properties. *Nanomedicine*, 10(1) :141–148. [1.3](#), [1.17](#)
- Wiche, G. (1998). Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J Cell Sci*, 111 (Pt 17) :2477–2486. [1.2.3.3](#)
- Wirtz, D. (2009). Particle-tracking microrheology of living cells : principles and applications. *Annu Rev Biophys*, 38 :301–326. [1.4.2](#)
- Wirtz, D., Konstantopoulos, K., and Searson, P. C. (2011). The physics of cancer : the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat Rev Cancer*, 11(7) :512–522. [1.3](#)
- Wittelsberger, S. C., Kleene, K., and Penman, S. (1981). Progressive loss of shape-responsive metabolic controls in cells with increasingly transformed phenotype. *Cell*, 24(3) :859–866. [1.3](#)
- Wootton, D. M. and Ku, D. N. (1999). Fluid mechanics of vascular systems, diseases, and thrombosis. *Annu Rev Biomed Eng*, 1 :299–329. [1.1.1](#)
- Yang, Y., Lin, J., Kaytanli, B., Saleh, O. A., and Valentine, M. T. (2012). Direct correlation between creep compliance and deformation in entangled and sparsely crosslinked microtubule networks. *Soft Matter*, 8 :1776–1784. [1.2.4](#)
- Yarmola, E. G., Somasundaram, T., Boring, T. A., Spector, I., and Bubb, M. R. (2000). Actin-latrunculin a structure and function. differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin a. *J Biol Chem*, 275(36) :28120–28127. [3.2.2](#)

-
- Yeung, A. and Evans, E. (1989). Cortical shell-liquid core model for passive flow of liquid-like spherical cells into micropipets. *Biophys J*, 56(1) :139–149. [1.1.1](#)
- You, H. X. and Yu, L. (1999). Atomic force microscopy imaging of living cells : progress, problems and prospects. *Methods Cell Sci*, 21(1) :1–17. [2.2.1](#)
- Zackroff, R. V. and Goldman, R. D. (1979). In vitro assembly of intermediate filaments from baby hamster kidney (bhk-21) cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(12) :6226–6230. [1.2.3.3](#)
- Zhu, C., Bao, G., and Wang, N. (2000). Cell mechanics : mechanical response, cell adhesion, and molecular deformation. *Annu Rev Biomed Eng*, 2 :189–226. [1.1](#), [1.1.1](#)

